

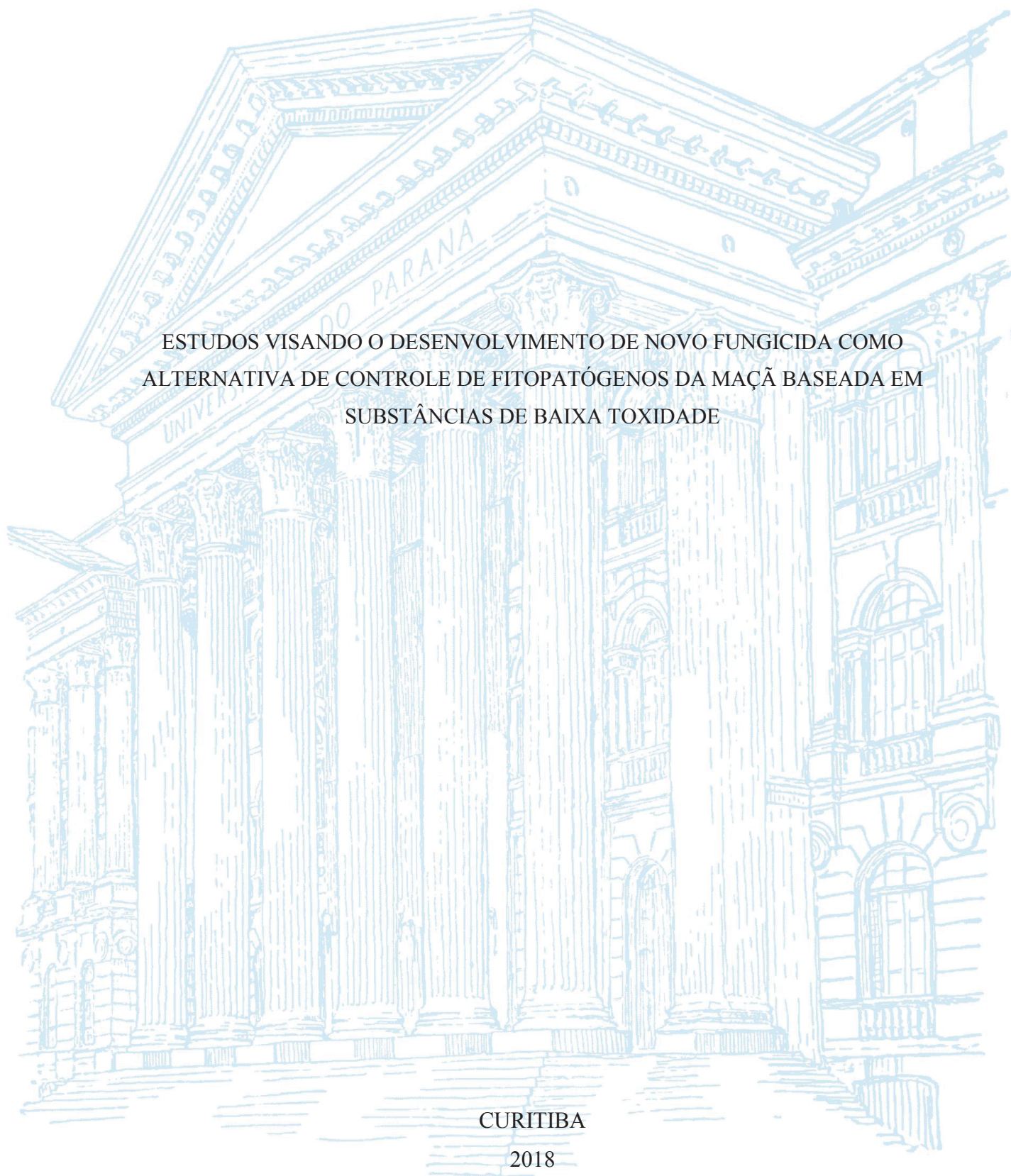
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENAN REISDÖRFER SCHORR

ESTUDOS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE NOVO FUNGICIDA COMO
ALTERNATIVA DE CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DA MAÇÃ BASEADA EM
SUBSTÂNCIAS DE BAIXA TOXIDADE

CURITIBA

2018



RENAN REISDÖRFER SCHORR

ESTUDOS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE NOVO FUNGICIDA COMO
ALTERNATIVA DE CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DA MAÇÃ BASEADA EM
SUBSTÂNCIAS DE BAIXA TOXIDADE

DISSERTAÇÃO APRESENTADA COMO
REQUISITO PARCIAL À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM QUÍMICA
ORGÂNICA, NO CURSO DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA, SETOR DE
CIÊNCIAS EXATAS, DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ.
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA
ORGÂNICA

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO
DE ASSIS MARQUES
CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA.
LOUISE LARISSA MAY DE MIO

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S374e

Schorr, Renan Reisdörfer

Estudos visando o desenvolvimento de novo fungicida como alternativa de controle de fitopatógenos da maçã baseada em substâncias de baixa toxicidade / Renan Reisdörfer Schorr. – Curitiba, 2018.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientador: Francisco de Assis Marques.Louise Larissa May de Mio

1. Fungicidas. 2. Ésteres. 3. Compostos fenólicos. 4. Colletotrichum. I. Universidade Federal do Paraná. II. Marques, Francisco de Assis. III. Título.

CDD: 632.952

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

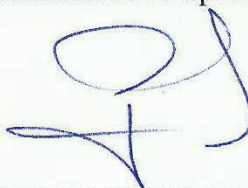
TERMO DE APROVAÇÃO

**ESTUDOS VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE NOVO FUNGICIDA
COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE DE FITOPATÓGENOS DA MAÇÃ
BASEADA EM SUBSTÂNCIAS DE BAIXA TOXIDADE**

por

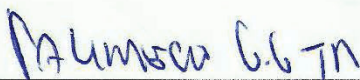
RENAN REISDÖRFER SCHORR

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:



Orientador:

Prof. Dr. Francisco de Assis Marques
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Palímécio Gimenes Guerrero Júnior
Departamento Acadêmico de Química e Biologia – UTFPR



Prof.ª Dr.ª Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia
Dep. de Química – UFPR

Curitiba. 28 de agosto de 2018.

Dedico este trabalho a minha mulher,
Ana Paula Konkol, pelo companheirismo,
dedicação, carinho, apoio e compreensão por
todos esses longos períodos de ausência. Aos
meus pais, Renê e Claudia Reisdörfer Schorr,
que nunca mediram esforços em apoiar-me em
todas as minhas escolhas e sempre estiveram
ao meu lado em todos esses anos. E a minha
irmã, Mariele Reisdörfer Schorr, pela nossa
amizade de sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Francisco de Assis Marques, por dedicar seu tempo, para me orientar e dividir sua rica experiência, conhecimentos e ensinamentos.

A minha co-orientadora, Prof^a Dra. Louise Larissa May de Mio, pelo tempo dedicado à minha orientação, pelos valiosíssimos conselhos e a enorme contribuição para a realização deste trabalho.

À Prof^a Dra. Beatriz Helena Lameiro De Noronha Sales Maia, pelas contribuições na banca de qualificação e pelo aceite em participar da banca de avaliação dessa dissertação.

Ao prof^o Dr. Palimecio Gimenes Guerrero Junior, pelo aceite em participar da banca de avaliação dessa dissertação.

Ao Prof^o Bráz Heleno de Oliveira, pelas valiosas contribuições com a avaliação deste trabalho na banca de qualificação.

À Prof^a Maria Élide Alves Stefanello, pela correção do relatório anual e contribuições a este trabalho.

A todos os professores do departamento de química por todo conhecimento transmitido.

À UFPR, em especial, ao departamento de Química e de Fitotecnia e Fitossanitarismo pela estrutura e equipamentos, sem eles este trabalho não seria possível.

Ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, pelas leituras das placas de microdiluição.

A todos os amigos do Laboratório de Ecologia Química e Síntese de produtos naturais (LECOSIN), do Laboratório de Epidemiologia e Manejo Integrado de Doenças (LEMID) e do departamento de química, por toda a ajuda, amizade, conselhos e momentos de descontração.

A todos os funcionários da UFPR pelo profissionalismo e dedicação que muito contribuiu para a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

Tornamos nosso mundo significativo
pela coragem de nossas perguntas e pela
profundidade de nossas respostas.

(Carl Sagan)

RESUMO

A produtividade da cultura da macieira é afetada pela ocorrência de problemas fitossanitários, como as doenças. Uma das doenças mais severas que ocorrem em macieiras é chamada de Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG), causadas por fungos do gênero *Colletotrichum spp.* Esta doença é de grande relevância para o Brasil, pois infecta a cultivar Gala e seus clones, cultivares de maior abrangência no país. Após a ocorrência da MFG, torna-se indispensável o uso de controle químico para o seu manejo, que é baseado principalmente em fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos. No entanto, o uso destes fungicidas, vêm se mostrando ineficaz, por não ser capaz de reduzir a população dos fitopatógenos em anos de maior pressão de inóculo. Por outro lado, deve-se considerar que os ditiocarbamatos são considerados extremamente tóxicos. Desta maneira, esta pesquisa avaliou a atividade biológica de substâncias presentes em óleos essenciais, bem como de alguns derivados, frente a fungos do gênero *Colletotrichum spp.*, buscando alternativas para o controle da MFG. Os compostos naturais utilizados para esta pesquisa foram, eugenol, isoeugenol, timol e carvacrol. A partir destes compostos preparou-se uma série de 12 ésteres (acetatos, butiratos e benzoatos), para serem testados contra os fitopatógenos da maçã *Colletotrichum fructicola* e *Colletotrichum nymphaeae*. Os compostos fenólicos, presentes em óleos essenciais, foram submetidos à esterificação, utilizando anidridos como agentes acilantes e piridina como solvente. Os produtos foram caracterizados por CG-EM, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Os ensaios biológicos realizados, para avaliar a atividade dos compostos frente aos fitopatógenos foram, teste do crescimento micelial, concentração inibitória mínima (CIM) e teste *ex vivo* de inibição dos sintomas de MFG por contato. Os compostos mais ativos na fase de crescimento micelial e da CIM dos fitopatógenos foram, timol, carvacrol e butirato de timoíla, inibindo totalmente o crescimento micelial na concentração de $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e apresentando CIM de $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. No teste *ex vivo*, obtiveram destaque, os compostos eugenol, timol, acetato de timoíla, acetato de carvacrila e butirato de carvacrila no controle da MFG causada por *Colletotrichum fructicola*. Os compostos eugenol, acetato de eugenila, butirato de timoíla, acetato de carvacrila e butirato de carvacrila, destacaram-se no controle da MFG causada por *Colletotrichum nymphaeae*.

Palavras-chave: Ésteres de eugenol, isoeugenol, timol e carvacrol. Mancha Foliar de *Glomerella*. Ensaio biológico. *Colletotrichum fructicola*. *Colletotrichum nymphaeae*.

ABSTRACT

The productivity of the apple tree crop is affected by the occurrence of phytosanitary problems, such as diseases. One of the most severe diseases that occur in apple trees is called *Glomerella* Leaf Spot (GLS), caused by fungi of the genus *Colletotrichum* spp. This disease is of great relevance for Brazil, as it infects the cultivar Gala and its clones, cultivars of greater comprehensiveness in the country. After the occurrence of GLS, it becomes indispensable the use of chemical control for its management, which is based mainly on fungicides of the dithiocarbamate group. However, the use of these fungicides has proved to be ineffective because it is not able to reduce the population of phytopathogens in years of higher inoculum pressure. On the other hand, dithiocarbamates should be considered as extremely toxic. In this way, this research evaluated the biological activity of substances present in essential oils, as well as of some derivatives, against fungi of the genus *Colletotrichum* spp., searching for alternatives for the control of GLS. The natural compounds used for this research were, eugenol, isoeugenol, thymol and carvacrol. From these compounds a series of 12 esters (acetates, butyrates and benzoates) were prepared for testing against the phytopathogens of the apple *Colletotrichum fructicola* and *Colletotrichum nymphaeae*. Phenolic compounds, present in essential oils, were subjected to esterification, using anhydrides as acylating agents and pyridine as solvent. The products were characterized by GC-MS, ^1H -NMR and ^{13}C -NMR. The biological assays performed to evaluate the activity of the compounds against phytopathogens were: mycelial growth test, minimum inhibitory concentration (MIC) and *ex vivo* test of inhibition of GLS symptoms by contact. The most active compounds in the mycelial growth phase and MIC of the phytopathogens were thymol, carvacrol and thymol butyrate, totally inhibiting $125\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ mycelial growth and presenting $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MIC. In the *ex vivo* test, the eugenol, thymol, thymol acetate, carvacrol acetate and carvacrol butyrate compounds were evaluated in the control of GLS caused by *Colletotrichum fructicola*. The compounds eugenol, eugenol acetate, thymol butyrate, carvacrol acetate and carvacrol butyrate were the most important in the control of GLS caused by *Colletotrichum nymphaeae*.

Key words: Esters of eugenol, isoeugenol, thymol and carvacrol. *Glomerella* Leaf Spot. Biological assays. *Colletotrichum fructicola*. *Colletotrichum nymphaeae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos e do grupo dos benzimidazois, usados no controle químico da MFG.....	17
Figura 2. a) Sintoma inicial de mancha foliar de <i>Glomerella</i> (MFG), b) lesão necrótica de cor marrom no centro da mancha difusa, c) folhas de ‘Gala’ apresentando senescência precoce e d) sintomas nos frutos;.....	19
Figura 3. Estrutura do Eugenol e Isoeugenol, Timol e Carvacrol.	22
Figura 4. Compostos majoritários de óleos essenciais com de destacada ação contra alguns fitopatógenos.	23
Figura 5. Ésteres derivados de timol e carvacrol, a) acetato, b) propionato, c) isobutirato, d) 3-metilbutanoato, e) (<i>E</i>)-but-2-enoato, f) benzoato e g) 2-fenilacetato de timoila ou carvacrila.	24
Figura 6. Compostos de estrutura análoga ao do carvacrol.	25
Figura 7. Esquema de montagem da placa de microdiluição.	42
Figura 8. Etapas da montagem do experimento <i>ex vivo</i> , a) tratamento das folhas, b) acomodação em caixa plástica gerbox, c) montagem da câmara úmida, d) inoculação das folhas e e) inóculo depositado sobre as folhas.	43
Figura 9. Severidade dos sintomas apresentados pela MFG, em que, a) necrose total, b) pontuações necróticas, c) e d) clorose.	44
Figura 10. Estruturas químicas dos a) compostos fenólicos selecionados para teste. b) Propostas de modificações estruturais nas substâncias fenólicas.	45
Figura 11. Derivados acetilados dos compostos fenólicos e rendimentos das suas obtenções.	46
Figura 12. Proposta de mecanismo de acetilação das substâncias fenólicas, utilizado timol como referência.	46
Figura 13. Cromatograma do produto da reação de formação de 3a e fragmentos de massas do produto majoritário.	47
Figura 14. a) Proposta de fragmentação via rearranjo com eliminação de ceteno. b) subsequente perda de radical metila.	48
Figura 15. Espectro de RMN de ¹ H (200MHz, CDCl ₃), correspondente ao composto 3a , com expansão da região entre 6,7 e 7,3 ppm e estrutura numerada.	48
Figura 16. Espectro de RMN de ¹³ C (50MHz, CDCl ₃) correspondente ao composto 3a , com expansão da região entre 20 e 28 ppm.	49
Figura 17. Derivados butirados dos compostos fenólicos e rendimentos das suas obtenções.	50

Figura 18. Cromatograma do produto da reação de formação de 3b e fragmentos de massas do produto majoritário da reação de formação de 3b	51
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3) correspondente ao composto 3b e estrutura numerada.	52
Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3) para a) 3a , b) 3b , com estrutura química numerada.	53
Figura 21. Derivados benzoilados dos compostos fenólicos e rendimentos das suas obtenções.	53
Figura 22. Cromatograma do produto da reação de formação de 3c e fragmentos de massas do produto.....	54
Figura 23. Proposta de fragmentação para composto 3c	55
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3) correspondente ao composto 3c , com expansão da região entre 6,8 e 8,4 ppm.....	55
Figura 25. Espectros de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3) para o a) composto 3a com expansão da região entre 20 e 28 ppm e b) composto 3c	56
Figura 26. Fragmentação de massas para (a) acetato de timoila e (b) acetato de carvacrila....	57
Figura 27. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (CDCl_3) para 3a	58
Figura 28. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (CDCl_3) para 4a	59
Figura 29. Expansão do mapa de correlação de RMN HMBC (CDCl_3) para a) 3a e b) 4a	60
Figura 30. Placa de Microdiluição no sétimo dia de teste frente a <i>C. nymphaeae</i> , em que, a) acetato de carvacrila (4a) em gradiente de concentração, b) controle positivo, c) controle negativo.	65
Figura 31. Teste em placa de Microdiluição, com acetato de eugenila (1a) frente a <i>C. nymphaeae</i> , em que, gradiente de concentração no, a1) dia 1, a2) dia 7, controle positivo no, b1) dia 1, b2) dia 7 e c) controle negativo dia 7.	66
Figura 32. Fitotoxidez causada por eugenol em, a) replicata 1 no dia 3, b) replicata 2 no dia 3, c) replicata 1 no dia 14, d) replicata 2 no dia 14, inoculadas com <i>C. fructicola</i>	72
Figura 33. Estruturas químicas e suas respectivas numerações.....	87
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 1a , com expansão da região entre 5,0 e 7,5.....	88
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 1b , com expansão da região entre 5,0 e 7,5.....	89
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 1c , com expansão da região entre 5,0 e 8,5.....	89

Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 2a , com expansão da região entre 5,5 e 7,5.....	90
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 2b , com expansão da região entre 5,5 e 7,5.....	90
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 2c , com expansão da região entre 6,0 e 8,5.....	91
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 3a , com expansão da região entre 6,5 e 7,5.....	92
Figura 41. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 3b , com expansão da região entre 6,7 e 7,4.....	92
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto 3c , com expansão da região entre 6,5 e 8,5.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações inibitórias mínimas apresentadas por alguns compostos frente a <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Tabela 2. Resumo dos efeitos de carvacrol e <i>p</i> -cimeno nos diferentes parâmetros estudados em <i>Bacillus cereus</i>	27
Tabela 3. Atribuições de carbonos e hidrogênios ligados diretamente e a longa distância, para 3a	58
Tabela 4. Atribuições de carbonos e hidrogênios ligados diretamente e a longa distância, para 4a	59
Tabela 5. Correlações a longa distância ^1H - ^{13}C para 3a e 4a	60
Tabela 6. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de <i>C. nymphaeae</i> e <i>C. fructicola</i> nas diferentes concentrações de derivados de óleos essenciais.	61
Tabela 7. Densidades óticas obtidas para teste com acetato de carvacrila (4a) frente ao fungo <i>C. nymphaeae</i>	64
Tabela 8. Densidades óticas obtidas para teste com acetato de eugenila (1a) frente ao fungo <i>C. nymphaeae</i>	65
Tabela 9. CIM obtido para os tratamentos frente a <i>C. nymphaeae</i> e <i>C. fructicola</i>	66
Tabela 10. Conversão da CIM ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para CIM ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).	67
Tabela 11. Valores de CIM encontradas por Abbaszadeh et al. contra vários fungos.	68
Tabela 12. Valores de log P e pKa dos compostos, 1 à 4c	70
Tabela 13. Melhores resultado encontrados para a fase de crescimento micelial e da CIM para <i>C. fructicola</i> e <i>C. nymphaeae</i>	71
Tabela 14. Resultados do teste <i>ex vivo</i> em folhas de macieira inoculadas com <i>C. fructicola</i> ..	72
Tabela 15. Resultados teste <i>ex vivo</i> em folhas de macieira inoculadas com <i>C. nymphaeae</i>	73
Tabela 16. Distribuição percentual dos sintomas de MFG de acordo com a sua severidade, para folhas inoculadas com <i>C. fructicola</i>	74
Tabela 17. Distribuição percentual dos sintomas de MFG de acordo com a sua severidade, para folhas inoculadas com <i>C. nymphaeae</i>	74
Tabela 18. Compostos com melhores resultados para cada um dos testes biológicos.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MFG	- Mancha Foliar de <i>Glomerella</i> ;
CIM	- Concentração Inibitória Mínima;
FAO	- Food and Agriculture Organization of the United Nations;
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;
MAPA	- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento;
AGROFIT	- Sistema de Agrotóxicos Fitossanitário;
IC	- Índice de controle;
ATP	- Trifosfato de adenosina;
FDA	- Food and Drug Administration;
ZI	- Zona de Inibição;
CLSM	- Confocal Laser Scanning Microscopy (Microscopia Confocal de Varredura à Laser);
CF-SE	- Carboxyfluorescein succinimidyl ester (Éster succinimidílico de carboxifluoresceína);
DNA	- Ácido desoxirribonucleico;
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura;
LECOSIN	- Laboratório de Ecologia Química e Sínteses de Produtos Naturais;
LEMID	- Laboratório de Epidemiologia e Manejo Integrado de Doenças;
DQUI	- Departamento de Química;
GC-MS	- Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas;
CCD	- Cromatografia em camada delgada;
BDA	- batata dextrose-ágar;
DMSO	-Dimetilsulfóxido;
NCCLS	- National Committee for Clinical Laboratory Standards;
BD	- Batata-dextrose;
DO	- Densidade ótica;
RMN	- Ressonância magnética nuclear;
m/z	- relação massa/carga;
u.m.a.	- unidade de massa atômica;
HSQC	- Heteronuclear Single Quantum Correlation;
HMBC	- Heteronuclear Multiple Bond Correlation;
NCBI	- National Center for Biotechnology Information.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Mancha Foliar de Glomerella	18
1.1.1 Controle dos fitopatógenos associados à MFG	19
1.1.2 Modo de Ação dos ditiocarbamatos	20
1.2 Óleos essenciais	21
1.2.1 Eugenol e Isoeugenol, Timol e Carvacrol	21
1.2.2 Mecanismos de ação de timol, carvacrol e eugenol	26
1.2.2.1 Atividade antibacteriana	26
1.2.2.2 Atividade antifúngica	28
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos específicos	31
3. METODOLOGIA	32
3.1 Modificações estruturais	33
3.1.1 Procedimento Geral para a preparação de derivados acetilados	33
3.1.2 Procedimento Geral para a preparação dos ésteres butíricos de Timol e Carvacrol.	35
3.1.3 Procedimento Geral para a preparação dos ésteres butíricos de Eugenol e Isoeugenol	36
3.1.4 Procedimento Geral para a preparação dos ésteres benzílicos dos compostos fenólicos.	38
3.2 Testes biológicos	40
3.2.1 Teste de inibição do crescimento micelial	40
3.2.2 Concentração inibitória mínima (CIM)	41
3.2.3 Teste <i>ex vivo</i>	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Acetatos derivados das substâncias fenólicas	45
4.2 Butiratos derivados das substâncias fenólicas	50
4.3 Benzoatos derivados das substâncias fenólicas	53

4.4	Diferenças espectrais entre os derivados acilados de timol e carvacrol	57
4.5	Teste do crescimento micelial	60
4.6	Concentração inibitória mínima	63
4.7	Teste <i>ex vivo</i>	71
5.	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXO 1	87
	ANEXO 2	88

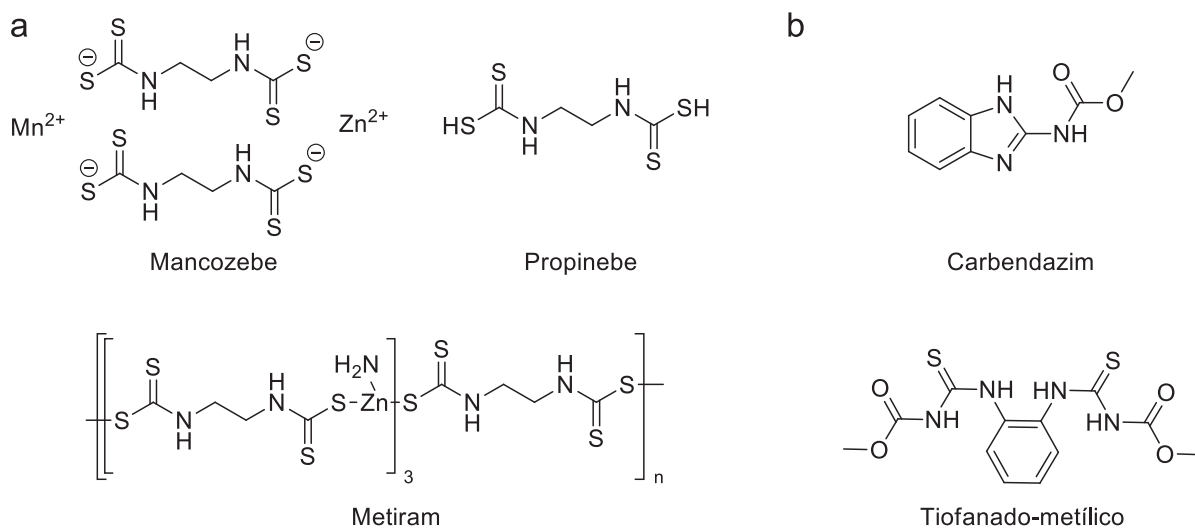
1. INTRODUÇÃO

A maçã é uma fruta de clima temperado, cultivada na Europa e Ásia desde a antiguidade. Sua variabilidade genética, permitiu a macieira, adaptar-se a diferentes ambientes. Atualmente encontra-se distribuída por quase todas as regiões do mundo, sendo consumidas das mais diversas formas (JANICK et al., 1996). Sua produção mundial alcançou o valor de 89.329.179 toneladas em 2016, sendo que a China, maior produtora da fruta, produziu 44.447.793 toneladas no ano de 2016 (FAO, 2018). O Brasil teve seus primeiros pomares comerciais na década de 70 (PETRI et al., 2011), em que, apresentou área colhida de 5.123 ha e produção de 34.192 toneladas no ano de 1975 (FAO, 2018). Atualmente o cultivo de maçãs estende-se por uma área de 33.244 ha com produção de 1.254.614 toneladas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017), situando-se entre os maiores produtores da fruta no mundo (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, MAPA, 2013).

A produtividade da cultura da macieira é afetada pela ocorrência de problemas fitossanitários, como por exemplo as doenças. Uma das doenças mais severas que ocorrem em macieiras é chamada de Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG), ou popularmente conhecida como Mancha da Gala. O primeiro agente causal identificado para a doença foi *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002), atualmente os fungos do gênero *Colletotrichum spp.* estão relacionados com a doença (KATSURAYAMA; BONETI e BECKER, 2000). Essa doença é de importância significativa no mundo, responsável por perdas de produtividade na China (Liu et al., 2016) e apresenta grande relevância para o Brasil, pois infecta a cultivar Gala e seus clones, cultivares de maior abrangência no país (KATSURAYAMA; BONETI; BECKER, 2000; PETRI et al., 2011).

Após a ocorrência da MFG, torna-se indispensável o uso de controle químico para o seu manejo (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002). No Ministério da Agricultura estão registrados para o controle da MFG em macieiras, 36 produtos comerciais, apresentando ingredientes ativos de diferentes grupos químicos, sendo os mais comuns, do grupo dos ditiocarbamatos, como mancozebe, propinebe e metiram, grupo dos benzimidazois, como carbendazim e tiofanato-metilico (Figura 1) e compostos inorgânicos, como óxido cuproso (MAPA, AGROFIT, 2018).

Figura 1. Fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos e do grupo dos benzimidazóis, usados no controle químico da MFG.



Apesar da eficiência dos fungicidas para controle de doenças de macieiras (FISCHER et al., 2012; KOWATA et al., 2010), seus usos contínuos podem selecionar fungos patogênicos resistentes, um dos principais problemas do controle químico, não apenas de doenças de plantas, mas também, na área da saúde pública (GHINI e KIMATI, 2002). Outra problemática está no fato de que a maioria dos fungicidas atualmente disponíveis no mercado, promovem risco eminente de exposição direta a humanos quando usados de maneira incorreta, além das restrições quanto ao uso de muitos destes produtos, devido a sua carcinogenicidade, teratogenicidade, toxicidade residual alta e aguda, longos períodos necessários para degradação, poluição ambiental, seus efeitos nos alimentos e outros efeitos colaterais em humanos (TRIPATHI e DUBEY, 2004).

Algumas pesquisas realizadas, constataram a existência de patógenos da macieira, resistentes aos principais princípios ativos utilizados para controle de doenças na cultura da macieira. Moreira et al., (2016), constataram que, dentre 39 isolados de *Colletotrichum* spp. expostos a diferentes concentrações *in vitro* dos fungicidas mancozebe e tiofanato-metilico (Figura 1), 21,4% dos isolados apresentaram-se resistentes ou altamente resistentes e 35,7% dos isolados foram moderadamente resistentes para mancozebe, tratando-se de tiofanato-metilico, 73,6% apresentaram-se resistentes ou altamente resistentes. Resultados semelhantes foram encontrados por outros pesquisadores (CHUNG et al., 2006; HAMADA, KATSURAYAMA e DANTAS, 2009; SUVARNA et al., 2009; TAM et al., 2008).

Portanto, é imprescindível desenvolver outras formas de controlar esses fungos, substituindo os fungicidas atualmente em uso, os quais causam tantos prejuízos para a saúde

humana e para o meio ambiente e para os quais os fungos já estão desenvolvendo resistência. Desta forma vislumbra-se poder possibilitar à sociedade alimentos mais seguros e uma relação mais equilibrada das metodologias de controle de pragas em geral com o meio ambiente.

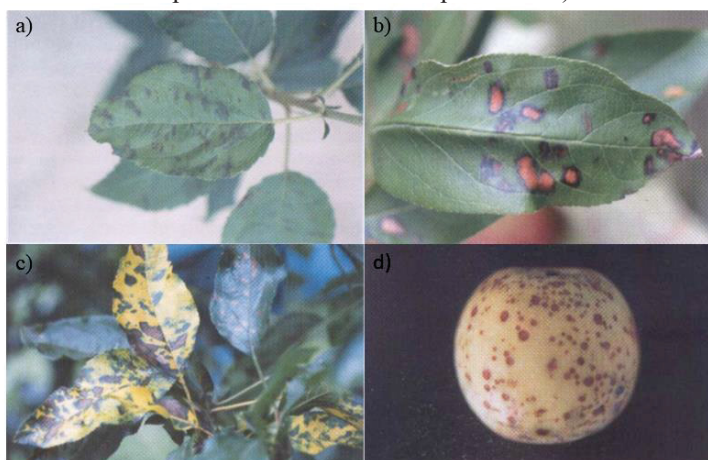
Na literatura mundial, há muitos trabalhos, indicando que o controle biológico de organismos fitopatogênicos (FERRAZ et al., 2016; GAVA et al., 2018; GIORGIO et al., 2015; ORO et al., 2018) são alternativas promissoras, que visam principalmente a substituição ou redução do uso de pesticidas mais tóxicos ao ser humano e ao meio ambiente. O controle biológico é proposto também para o controle dos fungos do gênero *Colletotrichum* spp., agentes causais de inúmeras doenças em plantas, além da cultura da macieira (PESCE et al., 2018; VILAPLANA et al., 2018; LIMA et al., 2014; TIAN et al., 2018).

Na mesma linha, emerge a utilização de óleos essenciais e seus componentes majoritários, na substituição de pesticidas mais tóxicos. Muitas destas substâncias têm eficácia comprovada na conservação de alimentos, evitando a proliferação de organismos causadores de prejuízos à qualidade e segurança alimentar (ABBASZADEH et al., 2014; HINTZ et al., 2015; NOSTRO et al., 2012). Ao mesmo tempo, inúmeros trabalhos mostram a sua eficácia no controle de organismos fitopatogênicos, podendo ser considerados como alternativas promissoras para o controle de doenças de plantas (ALZATE et al., 2009; CASTRO et al., 2017; TSAO e ZHOU, 2000; XIE et al., 2017).

1.1 Mancha Foliar de Glomerella

A principal doença de verão da macieira é a Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG) (Figura 2), pois infecta a Gala e seus clones, cultivares de maior abrangência no Brasil (KATSURAYAMA, BONETI e BECKER, 2000). Causada por espécies de fungos do gênero *Colletotrichum*, o principal dano provocado por esta doença é a desfolha precoce, que pode chegar a 75% em condições favoráveis à proliferação da doença (KATSURAYAMA e BONETI, 2009). Em macieiras, a queda prematura de folhas prejudica o acúmulo de reservas, impedindo uma boa diferenciação de gemas floríferas, o que acarreta em baixa produção e má qualidade de frutos na safra seguinte (KRETZCHMAR, MARODIN e DUARTE, 2005). Adicionalmente, o controle da MFG aumenta em 10% o custo de produção, em decorrência do valor associado ao controle químico, baseado principalmente em fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos (Figura 1)(KATSURAYAMA e BONETI, 2012). No entanto, em anos com maior pressão de inóculo a aplicação de fungicidas não é capaz de reduzir sua população (HAMADA, 2013).

Figura 2. a) Sintoma inicial de mancha foliar de *Glomerella* (MFG), b) lesão necrótica de cor marrom no centro da mancha difusa, c) folhas de ‘Gala’ apresentando senescência precoce e d) sintomas nos frutos;



Fonte: Katsurayama, Boneti e Becker, 2000;

A severidade de MFG nas plantas aumenta nos meses de janeiro e fevereiro, quando a temperatura ambiente ultrapassa os 20°C e o período de molhamento foliar é de 10 horas, sendo que os sintomas da doença podem ser observados 45 horas após a inoculação (HAMADA, 2005). No Paraná, a MFG atinge elevados níveis de severidade devido ao clima extremamente favorável, o que deixa os pomares em condição de alta pressão de inóculo (KOWATA et al., 2010).

1.1.1 Controle dos fitopatógenos associados à MFG

O controle da MFG tem sido efetuado com a aplicação, principalmente, de fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos (mancozebe, metiram e propinebe) (Figura 1), que apresentam alto índice de controle (IC) no início do ciclo vegetativo da macieira (IC > 80%) e mediano (IC > 70%) no final, quando a pressão do inóculo aumenta (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002; KATSURAYAMA e BONETI, 2009; KATSURAYAMA e BONETI, 2012).

Os fungicidas que possuem como princípio ativo, moléculas da classe dos ditiocarbamatos, podem ser classificados como fungicidas protetores. Este tipo de fungicida complementa as defesas da planta, formando uma barreira química superficial para prevenir ou proteger contra infecções. Devido as suas próprias características e modos de ação, este tipo de fungicida deve ser aplicado antes da tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro (NARAYANASAMY, 2006).

O controle baseado na aplicação de fungicidas protetores resulta em elevado número de pulverizações, que pode chegar a 15 por safra no estado de Santa Catarina (KATSURAYAMA

e BONETI, 2012). Entretanto, as normas de Produção Integrada de Maçã no Brasil (IN SDC Nº 01 de 14/09/2006) limitam o uso de fungicidas por safra, muitas vezes inviabilizando esse sistema de controle. Outro problema é o período que antecede a colheita por ser o mais crítico em relação ao ataque da doença. Pode-se afirmar que os tratamentos utilizados atualmente não são eficazes devido às restrições quanto ao período de carência dos fungicidas (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002; KATSURAYAMA e BONETI, 2009; KATSURAYAMA e BONETI, 2012).

Outro cenário preocupante foi encontrado em investigação sobre a sobrevivência do complexo *Colletotrichum* em maçã nas condições dos pomares comerciais brasileiros, realizada por Hamada e May de Mio (2017), que, investigaram a sobrevivência de *Colletotrichum* spp. em órgãos dormentes, folhas caídas e amostras de solo, em pomares comerciais de macieiras pulverizados com fungicidas durante inverno, no estado do Paraná. Neste estudo, todos os isolados (16) de galhos dormentes e folhas caídas, foram identificadas como espécies do complexo *C. acutatum*. Cinco (5) isolados de gemas dormentes foram identificados como do complexo de espécies *C. gloeosporioides* e três (3) como do complexo de espécies de *C. acutatum*. Os dados mostram que, *Colletotrichum* spp. são capazes de sobreviver durante o inverno em folhas caídas, gemas e galhos dormentes e que pulverizações realizadas com caldas a base de sais e óxidos de cobre, durante o estágio de dormência, não são capazes de eliminar completamente o inoculo.

Outro fator importante a ser considerado é a toxicidade dos ditiocarbamatos, que afetam o sistema nervoso periférico levando a degenerações como às observadas no mal de Parkinson (FRISONI e DI MONDA, 1989), além de poderem causar infertilidade (COOPER et al., 1999; CECCONI et al., 2007) e câncer (HOUEETO et al., 1995).

1.1.2 Modo de Ação dos ditiocarbamatos

Os ditiocarbamatos, assim como, os fungicidas protetores da primeira geração (calda bordalesa, fungicidas a base de mercúrio, enxofre elementar, dicarboxamidas, ftalamidas), são conhecidos por serem inibidores multisítios, os quais interferem em processos metabólicos centrais do fungo alvo. De fato, a maioria deste fungicidas são capazes de afetar a produção de energia ou ATP, também por inibição da respiração ou por desacoplamento da fosforilação oxidativa. Fungicidas baseados em metais, tal como cobre e mercúrio, inibem uma grande variedade de enzimas envolvidas em várias rotas metabólicas. Similarmente o complexo ditiocarbamatos, inativa enzimas causando a morte celular (NARAYANASAMY, 2006).

1.2 Óleos essenciais

Óleos essenciais de diferentes plantas têm mostrado atividade frente a vários microrganismos patogênicos, agentes que causam inúmeros prejuízos tanto à saúde humana e animal quanto danos econômicos (BHARDWAJ et al., 2010; CASTRO et al., 2017; MICHIELS et al., 2007; DE MORAIS et al., 2014; STARLIPER et al., 2015). Desta maneira o uso de óleos essenciais e ou de produtos naturais, podem se tornar uma alternativa para auxiliar ou até mesmo substituir os agrotóxicos sintéticos mais tóxicos.

Os óleos essenciais são conhecidos por suas propriedades anticépticas, bactericidas, fungicidas, medicinais e por suas fragrâncias. São usados em embalagens, na preservação de alimentos, como analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios e anestésicos locais (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004).

Na natureza, óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção da planta contra bactérias, vírus, fungos, insetos e contra herbívoros. Eles também podem atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes (BAKKALI et al., 2008; TRIPATHI e DUBEY, 2004). A composição e a quantidade de óleo essencial de uma certa espécie de planta em particular, pode diferir entre estações de colheita e posição geográfica (BAKKALI et al., 2008; TRIPATHI e DUBEY, 2004).

Óleos essenciais podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta, por exemplo, brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou casca, e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Essa mistura natural complexa pode conter, normalmente, entre 20 e 60 componentes em diferentes concentrações. Alguns são caracterizados por possuírem dois ou três componentes majoritários em altas concentrações (20 a 70%). As propriedades biológicas dos óleos essenciais podem ser determinadas pelos componentes majoritários bem como podem ser resultado de qualquer combinação mais complexa entre seus componentes (BAKKALI et al., 2008; TRIPATHI e DUBEY, 2004).

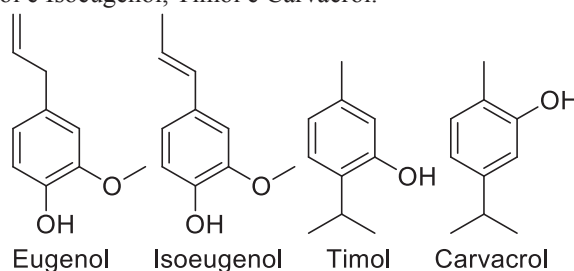
1.2.1 Eugenol e Isoeugenol, Timol e Carvacrol

Eugenol e isoeugenol (Figura 3) são encontrados frequentemente como componentes majoritários dos óleos essenciais das espécies *Eugenia caryophyllata*, *Cimnopogon deial*, *Syzygium aromaticum* (cravo da índia), *Cinnamomum zeylanicum* (canela) (AMIRI et al., 2008; COMBRINCK et al., 2011; XIE et al., 2017). São classificados como arilpropanoides (BAKKALI et al., 2008). O eugenol pode ser usado em aplicações tópicas para aliviar a dor e

promover a cicatrização e também é usado na medicina, e nas indústrias de fragrâncias e flavorizantes. Eugenol, também é conhecido por sua atividade antimicrobica, contra patógenos de plantas e animais (CHAIEB et al., 2007). O óleo de cravo da Índia foi listado como um produto “geralmente considerado seguro” pela agência americana FDA, podendo então, ser usado inclusive como aditivo alimentar contra deterioração causada por fungos e bactérias (KILDEAA, ALLANB e KEARNEY, 2004).

Timol e Carvacrol pertencem a classe dos monoterpenos, geralmente encontrados em plantas aromáticas, são compostos majoritários dos óleos essenciais das espécies, *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) (tomilho), *Origanum vulgare* (orégano), *Origanum compactum*, entre outras (BAKKALI et al., 2008; FORNARI et al., 2012; TRIPATHI e DUBEY, 2004). Apresentam ampla atividade biológica, sendo conhecidos como anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antifúngico e anticarcinogênico (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; TRIPATHI e DUBEY, 2004). Tanto timol, carvacrol e o já citado eugenol, quanto outros componentes que ocorrem em óleos essenciais (carvona, cinamaldeído, citral, *p*-cimeno, limoneno e mentol) foram registrados pela Comissão Europeia para uso como tempero em alimentos devido à falta de risco para a saúde do consumidor. A agência americana FDA também classifica estas substâncias como "seguras" (MARCHESE et al., 2016). A gama de atividades biológicas exibidas por timol e carvacrol, tornaram-nos amplamente estudados (SVIRCEV et al., 2007; ALZATE et al., 2009), como também, a relação entre suas estruturas e as atividades biológicas apresentadas, bem como, o modo de ação que apresentam sobre microrganismos (ULTEE et al., 2002; LAMBERT et al., 2001; VELDHUIZEN et al. 2006).

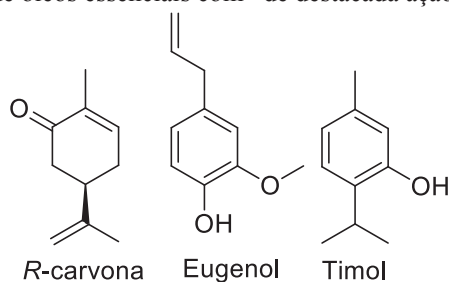
Figura 3. Estrutura do Eugenol e Isoeugenol, Timol e Carvacrol.



Com a proposta de encontrar alternativas aos fungicidas sintéticos, para controle de 5 fitopatógenos, Combrinck et al. (2011), avaliaram a atividade antifúngica de 18 óleos essenciais, *in vitro*, frente a *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria citrii*, *Botrytis cinerea* e *Penicillium digitatum*, isolados de mangas, abacates, citros, uvas e pera de cactus, respectivamente. Dentre os óleos essenciais testados, 3 deles,

Cinnamomum zeylanicum (rico em eugenol, 81,2%), *Thymus vulgaris* (timol 63,1%) e *Mentha spicata* (*R*-carvona 87,9%), destacaram-se pela baixa concentração na qual foram capazes de controlar totalmente o crescimento micelial destes fungos. Quando testados separadamente os compostos majoritários destes óleos essenciais (Figura 4), apresentaram atividade semelhante ou superior à dos óleos essenciais. Eugenol inibiu totalmente o crescimento dos fungos, *L. theobromae*, *A. citrii*, *B. cinerea* e *P. digitatum*, na concentração de $500 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto timol, na mesma concentração ($500 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$) inibiu o crescimento, além dos fungos já citados, de *Colletotrichum gloeosporioides*. A *R*-carvona mostrou bons resultados frente a dois isolados de citros, inibindo totalmente o desenvolvimento de *P. digitatum* isolados de laranjas, na concentração de $1000 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$.

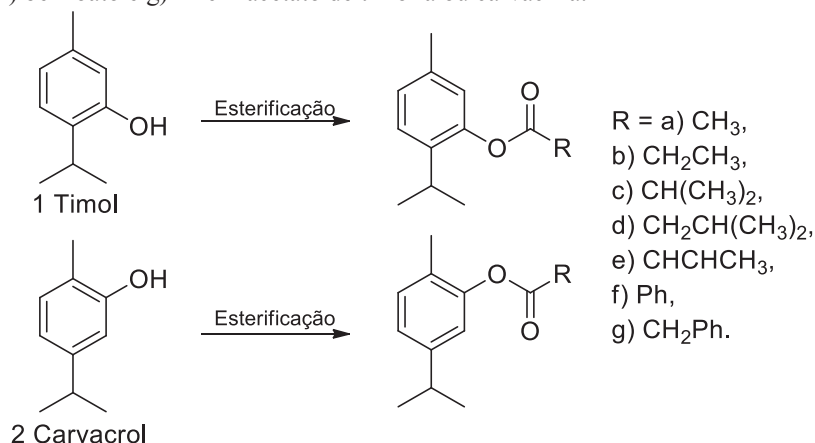
Figura 4. Compostos majoritários de óleos essenciais com de destacada ação contra alguns fitopatógenos.



Zhou et al.(2018), determinaram a efetividade com que, *in vitro*, carvacrol e eugenol inibiram o crescimento micelial, na fase de vapor e a germinação de conídios do fungo *Rhizopus stolonifer*, um importante patógeno causador de perdas no pós-colheita de pêssegos. O vapor do óleo de carvacrol mostrou ser mais efetivo, inibindo 100% do crescimento micelial de *R. stolonifer* com 2 μL por placa de Petri, enquanto que para fumigação com eugenol o crescimento do fungo foi totalmente inibido com 4 μL por placa. No teste de germinação de esporos, os óleos de carvacrol e eugenol inibiram 100% da germinação nas concentrações de $25 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ e $50 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Mathela, Singh e Gupta (2010), avaliaram a atividade bactericida de quatorze ésteres derivados de timol e carvacrol, representados na Figura 5, contra quatro bactérias Gran-positivas (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*) e uma Gran-negativa (*Escherichia coli*), organismos que são patogênicos para humanos, causadores de inúmeras complicações e distúrbios.

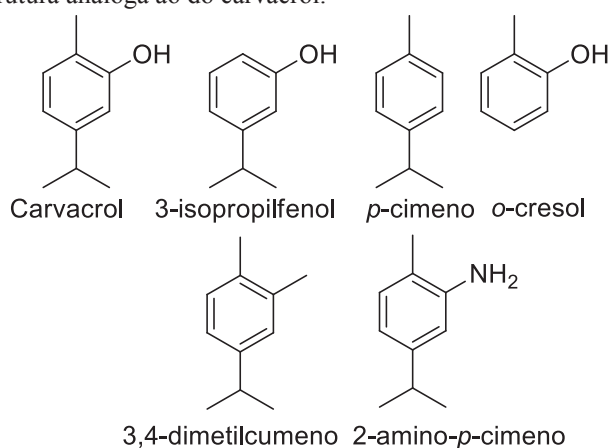
Figura 5. Ésteres derivados de timol e carvacrol, a) acetato, b) propionato, c) isobutirato, d) 3-metilbutanoato, e) (*E*)-but-2-enoato, f) benzoato e g) 2-fenilacetato de timoila ou carvacrila.



Os derivados do carvacrol, benzoato de carvacrila (composto, 2f) e 2-fenilacetato de carvacrila (2g), foram inativos contra todas as cepas bacterianas. Contra *S. mutans*, os compostos mais ativos foram carvacrol (2) e acetato de timoila (1a) (zona de inibição (ZI) = 30 mm e 30 mm; concentração inibitória mínima (CIM) = 23,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 11,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente). Para *S. aureus* os compostos mais ativos foram os próprios compostos precursores timol e carvacrol (1 e 2 respectivamente) (ZI = 25 mm e 25 mm; CIM = 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 23,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Contra *B. subtilis* os compostos mais ativos foram, carvacrol (2) e acetato de timoila (1a) (ZI = 35 mm e 30 mm; CIM = 11,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 11,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente). Acetato de timoila (1a) e propionato de timoila (1b), mostraram a maior atividade contra *S. epidermis* (ZI = 25 mm e 25 mm; CIM = 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 23,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Contra *E. coli* carvacrol (2) se mostrou o mais ativo (ZI = 35 mm e CIM = 11,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Outros dois compostos, embora não tenham sido os mais ativos, apresentaram comparativamente boa atividade contra as bactérias testadas, isobutirato de timoila (4c) e 3-metilbutanoato de carvacrila (5d) (contra *B. subtilis*, 4c: ZI = 21 mm, CIM = 46,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 5d: ZI = 25 mm, CIM = 23,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os demais compostos foram muito menos ativos ou não mostraram atividade. De maneira geral, as derivatizações de timol para acetato, propionato e isobutirato de timoila (1a, 1b, 1c), melhoraram a sua atividade bactericida. Os derivados com substituintes maiores, 3-metilbutanoato (1d), (*E*)-but-2-enoato (1e), benzoato (1f) e 2-fenilacetato (1g) de timoila foram muito menos ativos contra todas as bactérias testadas. Carvacrol (2) mostrou-se muito mais efetivo contra todos os microrganismos, se comparado aos seus derivados (MATHELA, SINGH e GUPTA, 2010).

A fim de determinar o requerimento estrutural necessário para a atividade antimicrobiana de carvacrol, Veldhuizen et al. (2006), testaram compostos com estruturas análogas ao do carvacrol (Figura 6, p. 25).

Figura 6. Compostos de estrutura análoga ao do carvacrol.



Estes compostos foram escolhidos para poder observar a importância que, os substituintes do anel aromático, apresentam na atividade antibacteriana do carvacrol. Os compostos análogos ao carvacrol foram divididos em dois grupos de abordagem, o primeiro grupo eliminou um por vez os substituintes do anel aromático, em que 3-isopropilfenol elimina o grupo metila, *o*-cresol elimina o grupo isopropila e *p*-cimeno elimina a hidroxila no anel aromático (Figura 6). O segundo grupo avaliou a importância da hidroxila no anel aromático, para isso o composto 3,4-dimetilcumeno substitui a hidroxila do anel aromático por um grupo metila e 2-amino-*p*-cimeno substitui a hidroxila pelo grupo amina (Figura 6). A atividade de carvacrol e seus compostos análogos foram testados frente a duas bactérias, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. As concentrações inibitórias mínimas que os compostos apresentaram contra, *E. coli* e *S. aureus*, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações inibitórias mínimas apresentadas por alguns compostos frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Substância	Concentração inibitória mínima (CIM) em mmol·L ⁻¹	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
carvacrol	1,2	1,7
3-isopropilfenol	1,7	2,6
<i>o</i> -cresol	3,0	3,0
2-amino- <i>p</i> -cimeno	4,0	5,9
<i>p</i> -cimeno	36,0	36,0
3,4-dimetilcumeno	36,0	36,0

Fonte: Veldhuizen et al., 2006.

Os pesquisadores concluíram que, as cadeias alifáticas laterais de carvacrol tem pequeno efeito sobre a atividade, provavelmente devido a interação com a membrana bacteriana. A exclusão do grupo hidroxila, como ocorre no *p*-cimeno e 3,4-dimetilcumeno, resulta na perda

total da atividade. A substituição da hidroxila fenólica pelo grupo amina (2-amino-*p*-cimeno) resultou em perda sutil da atividade. Por tanto a hidroxila não é essencial para a sua atividade, porém possui características especiais que atuam em seu modo de ação.

1.2.2 Mecanismos de ação de timol, carvacrol e eugenol

1.2.2.1 Atividade antibacteriana

Lambert et al. (2001), investigaram o modo de ação do óleo essencial de orégano e seus constituintes principais (timol e carvacrol), observando a integridade da membrana celular, o efluxo de íons e o pH interno, utilizando os patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, como microrganismos modelo.

Para investigar a integridade da parede celular os pesquisadores utilizaram a técnica de Microscopia Confocal de Varredura à Laser (CLSM, sigla em inglês), sendo que para a coloração do material utilizou-se brometo de etídio. A fluorescência devido ao brometo de etídio foi insignificante e não se alterou na suspensão de controle das células bacterianas durante todo o período de incubação, enquanto que, a adição de 0,1% de óleo essencial de orégano, timol ou carvacrol, resultam em alta porcentagem (90% \pm 0,7) de células fluorescentes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Tais observações indicam que óleo essencial de orégano e seus componentes prejudicaram a membrana celular e tornou os ácidos nucleicos intracelulares, acessíveis a brometo de etídio.

O pH intracelular foi medido através da determinação da fluorescência pH-dependente do Éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CF-SE, sigla em inglês), com sonda fluorescente. A suspensão bacteriana (1 mL) foi tratada com óleo essencial de orégano (18 a 36 μ L) e seu pH foi diminuído progressivamente (5,8 a 4). O gradiente de pH das bactérias examinadas no presente estudo foi rapidamente dissipado após a adição de óleo essencial de orégano.

Para a determinação do efluxo de íons potássio e fosfato, as células foram tratadas com óleo essencial de orégano (18 a 36 μ L) e a quantidade de potássio e fosfato extracelular foi medida com eletrodo de íon seletivo (Russell) e kit inorgânico para fósforo inorgânico (670-A, Sigma Diagnostics), respectivamente. O efluxo de ambos os íons foi observado após a adição de óleo essencial de orégano, não observado no controle. Este resultado sugere que o aumento da permeabilidade da membrana é um fator no mecanismo de ação antimicrobiana.

Cristani et al. (2007), também empregaram marcadores fluorescentes para avaliar o mecanismo de ação destes compostos, frente as bactérias *Escherichia coli* (Gram-negativa) e

Staphylococcus aureus (Gram-Positiva). Os pesquisadores sugerem que, o mecanismo de ação do timol e do carvacrol estão associados com a capacidade que estes apresentam em atravessar a membrana celular causando uma perturbação na membrana plasmática do microrganismo, esta capacidade pode estar associada com as características físico-químicas destas moléculas, devido as suas características lipofílicas e ao mesmo tempo, apresentam uma certa solubilidade em água. Outros estudos utilizando diferentes bactérias como modelo, também sugerem que a atividade antimicrobica destes compostos está relacionada com a alteração da permeabilidade da membrana celular (HELANDER et al., 1998; LA STORIA et al., 2011).

Ultee et al. (2002), utilizaram *Bacillus cereus*, para investigar o mecanismo de ação do carvacrol, também utilizaram *p*-cimeno (Figura 6, p. 25), afim de comparar as suas ações. Tanto carvacrol quanto *p*-cimeno foram capazes de se acumular na membrana e causar a sua expansão, *p*-cimeno causou uma expansão 2,7 vezes maior do que carvacrol. Ambos, causaram diminuição no potencial da membrana, sugerindo a ocorrência de vazamento de íons. Entretanto, *p*-cimeno não inibiu o crescimento de *B. cereus*, mostrando que o maior acúmulo na membrana e a diminuição do potencial de membrana sozinho não é capaz de diminuir a sua viabilidade. Os pesquisadores ainda investigaram a interferência de ambas as moléculas, no pH intracelular e na quantidade de ATP no meio celular, os resultados encontrados estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo dos efeitos de carvacrol e *p*-cimeno nos diferentes parâmetros estudados em *Bacillus cereus*.

Agente antimicrobiano	Expansão da membrana	Potencial de membrana	Efeito no:		
			Δ pH	ATP	Crescimento
Carvacrol	+	++	++	++	++
<i>p</i> -Cimeno	++	+	-	-	-

++, forte efeito, +, efeito, -, nenhum efeito.

Fonte: adaptado de Ultee et al. (2002);

Com base nos resultados encontrados, os autores propõem que o carvacrol desestabiliza a membrana citoplasmática e, além disso, atua como um trocador de prótons, reduzindo assim o gradiente de pH através da membrana citoplasmática. O colapso resultante da força próton-motriz e esgotamento do ATP conduz eventualmente à morte celular. Outras pesquisas, posteriormente realizadas, corroboram as conclusões encontradas por Ultee et al., (2002) (XU et al., 2008; HAMMER e HEEL, 2012; LA STORIA et al., 2011; GILL e HOLLEY, 2006; DI PASQUA et al., 2007; ULTEE et al., 1999).

Eugenol e o óleo de cravo da Índia, assim como indicado para timol, carvacrol e óleo de orégano, podem provocar, segundo Hammer e Heel (2012), danos à membrana celular das

bactérias testadas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*), provocando a sua despolarização e aumentando a sua permeabilidade, consequentemente causando a perda de conteúdo intracelular. Xu et al. (2016), apontam que, o óleo de cravo da Índia (eugenol 76,3%), primeiramente é capaz de destruir a parede celular e as membranas, causando perda de material intracelular vital, além disto, o óleo essencial penetra na membrana citoplasmática ou entra no interior da célula após a destruição da estrutura celular, e então inibe a síntese normal do DNA e de proteínas que são requeridas para o crescimento bacteriano (*Staphylococcus aureus*).

1.2.2.2 Atividade antifúngica

Rao et al. (2010), utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como organismo modelo para explorar o mecanismo de ação de carvacrol, timol, eugenol, vanilina, *p*-cimeno, γ -terpinene e guaiacol, através da investigação da ação destes compostos sobre a atividade metabólica, pH citosólico e vacuolar e transiente de Ca^{2+} .

Carvacrol mostrou-se mais potente contra *S. cerevisiae* ($\text{CIM} = 79,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), timol foi ligeiramente menos efetivo que seu isômero estrutural, enquanto que eugenol foi significativamente menos efetivo que ambos. Os demais compostos testados, vanilina, guaiacol, *p*-cimeno e γ -terpinene, foram inativos.

Para monitorar a perda de atividade metabólica provocada por carvacrol, usou-se o indicador de fluorescência FUN-1 (Invitrogen). A perda de atividade metabólica foi dependente da concentração de carvacrol, que induziu fortemente a perda de atividade metabólica na levedura.

O transiente de cálcio, foi monitorado, utilizando-se o complexo aequorina-coelenterazina, que emite luz após estar ligado com Ca^{2+} e a intensidade da luminescência está quantitativamente relacionada com a concentração de Ca^{2+} . Após a adição de carvacrol (0,0125 a 0,05%) pode-se observar imediata elevação na concentração de Ca^{2+} citosólico, seguido por um decréscimo de sua concentração entre 1 e 2 min. Supõem-se que há um rápido influxo de Ca^{2+} a partir do meio extracelular e a partir do vacúolo, seguido pelo seu efluxo para reservas celulares e concomitante dessensibilização dos canais. Esse aumento abrupto de Ca^{2+} também foi observada para timol, enquanto que para eugenol o aumento de concentração se deu em menor amplitude, o restante dos compostos testados, falharam em provocar qualquer mudança na luminescência durante o ensaio. A habilidade de provocar o aumento abrupto de íons Ca^{2+} está bem correlacionada com as suas atividades antifúngicas.

O pH vacuolar e citosólico foi medido, utilizando o corante fluorescente BCECF, sensível ao pH. A adição de carvacrol (0,05%) provocou aumento do pH vacuolar em 0,5 unidade, sugerindo a perda de H^+ do vacúolo, enquanto que, o carvacrol foi capaz de induzir a rápida acidificação do citosol, reduzindo o pH citosólico cerca de 0,5 unidade. Desta forma, pode-se propor que carvacrol, perturba ambas homeostases de Ca^{2+} e H^+ em leveduras e estas interrupções provavelmente levam à inviabilidade celular.

Tomando eugenol como composto antifúngico e utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, Roberts et al. (2014), apontam que, a atividade antifúngica de eugenol, não pareceu estar acoplada ao influxo de Ca^{2+} ou à elevação do Ca^{2+} citosólico, ou seja, a toxicidade do eugenol não é dependente de um influxo tóxico de Ca^{2+} . Em contraste, o controle cuidadoso do Ca^{2+} extracelular, revelou que a tolerância da levedura ao eugenol dependia do influxo de Ca^{2+} via canais específicos.

Gao et al. (2016), investigaram o mecanismo de ação antifúngico de timol sobre o fungo fitopatogênico filamentoso, *Fusarium graminearum*.

Os pesquisadores puderam observar, através de um microscópio de luz, que após 12 h de tratamento com timol, houve aumento na quantidade de vacúolos no interior das hifas, tornando-as mais escurecidas e curtas se comparadas ao controle, este aumento na quantidade de vacúolos pode indicar uma resposta ao possível estresse osmótico após tratamento, sendo que não foi observada alteração significativa na morfologia dos conídios. Através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), ficou evidente as alterações causadas por timol na estrutura das hifas de *F. graminearum*. Foi possível observar nas hifas tratada com timol ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), enrugamento irregular e perda da forma celular. Após tratamento com alta concentração de timol ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), observou-se colapso e ruptura das hifas.

Para efeito de timol sobre a membrana celular, utilizou-se o corante iodeto de propídeo, o qual mostrou que o tratamento com timol levou à injúria da membrana celular. Foi possível também detectar que, após tratamento com timol a condutividade relativa de *F. graminearum* aumentou, se comparado ao controle, indicando vazamento de íons devido ao aumento da permeabilidade da membrana celular. Este aumento da permeabilidade celular pode levar a um estado de estresse osmótico, o glicerol intracelular desempenha um importante papel na resposta dos fungos a este estresse osmótico. O estudo desenvolvido mostrou que o conteúdo de glicerol aumentou significativamente com tratamento de timol de maneira dose-dependente, indicando que o fungo, através da concentração de glicerol, tenta manter o balanço osmótico. O conteúdo de ergosterol, um importante componente da membrana celular de fungos

responsável por manter sua integridade e funcionalidade, também tem seus níveis alterados, após tratamento com timol houve diminuição do seu conteúdo.

Através de técnicas genéticas, detectou-se a expressão de muitos genes relacionados à rota biossintética do ergosterol. Os resultados sugerem que o tratamento com timol ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) causou uma diminuição significativa na expressão de quatro genes indispensáveis para biossíntese e distribuição de ergosterol.

De forma similar, Chavan e Tupe (2014), utilizando leveduras que causam prejuízos à produção de vinhos, Romero et al. (2009), utilizando fungos fitopatogênicos e Ahmad et al. (2011), utilizando espécies de *Candida*, sensíveis e resistentes ao fluconazol, também concluíram que timol e carvacrol exerceram sua ação antimicrobiana através de danos causados na membrana, vazamento de conteúdo citoplasmático e depleção de ergosterol. As descobertas feitas por Khan et al. (2013), também sugerem que os efeitos de danificação da membrana causada por eugenol são atribuídos à sua capacidade de inibir a biossíntese do ergosterol e simultaneamente se ligar ao ergosterol.

2. OBJETIVOS

Avaliar a atividade biológica de substâncias presentes em óleos essenciais, bem como de alguns derivados, frente a fungos do gênero *Colletotrichum* spp., buscando alternativas para o controle da Mancha Foliar de *Glomerella*.

2.1 Objetivos específicos

- Fazer derivatizações em substâncias naturais presentes em óleos essenciais, já identificadas em estudo anterior realizado em nosso laboratório, visando estabelecer uma relação estrutura/atividade.
- Determinar as atividades dessas substâncias frente ao crescimento micelial e à germinação de conídios de *Colletotrichum fructicola* e *Colletotrichum nymphaeae*.
- Testar a capacidade protetora dos compostos de maior atividade, em teste *ex vivo*, com folha destacada de macieira, afim de avaliar as suas habilidades em inibir o aparecimento da MFG.

3. METODOLOGIA

O trabalho experimental foi desenvolvido em duas partes. Na primeira parte foram realizadas as modificações estruturais dos compostos, realizadas no Laboratório de Ecologia Química e Sínteses de Produtos Naturais (LECOSIN), do departamento de Química (DQUI). As substâncias sintetizadas foram caracterizadas por análise via cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GCMS-QP2010 Plus, SHIMADZU), espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (4,7 tesla, Bruker). Na segunda parte, foram feitos testes biológicos no Laboratório de Epidemiologia e Manejo Integrado de Doenças (LEMID), do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, localizado no Campus de Ciências Agrárias II da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Para a síntese dos compostos foram utilizados produtos comerciais de pureza analítica. Todas as reações foram monitoradas via cromatografia em camada delgada (CCD), através de comparações com padrões das substâncias de partida.

Nas análises por CCD para o monitoramento de reações e avaliação da pureza de reagentes e produtos, foram empregadas cromatofolhas de alumínio AL TLC, recortadas nas dimensões de interesse, revestidas com sílica gel 60 F254, contendo indicador fluorescente (Merck). A revelação das cromatofolhas se deu em câmara com radiação ultravioleta (254 nm UV-C).

Na purificação dos compostos sintetizados empregaram-se técnicas cromatográficas em coluna (Still, Kahn e Mitra, 1978), utilizando coluna com as dimensões de 30 mm/650 mm, ou cromatografia em coluna dry flash (Shusterman, McDougal e Glasfeld, 1997), utilizando coluna de 30 mm/ 150 mm. Os adsorventes empregados foram sílica gel H (Merck) com granulometria de 40-63 µm e sílica gel 60 G 230-400 mesh (Merck), respectivamente. A mistura de solventes utilizados para as purificações foram, hexano/acetato de etila ou hexano/acetona (solventes previamente destilados), variando as proporções entre os solventes de 7/1 até 9/1, respectivamente

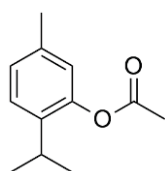
As reações foram efetuadas em meio anidro e sob atmosfera de gás argônio, utilizando todos os equipamentos e vidrarias necessárias para realizá-las. As técnicas empregadas no desenvolvimento dos trabalhos experimentais foram baseadas na literatura especializada e adaptadas, quando necessário, para obtenção de melhores resultados.

3.1 Modificações estruturais

3.1.1 Procedimento Geral para a preparação de derivados acetilados.

Baseando-se na metodologia descrita por De Moraes et al., 2014, em um balão de 100 mL, sob atmosfera de Ar, adicionou-se o composto fenólico (26 mmol) e piridina (39 mmol, 3,08 g, 3,14 mL). Após 5 min de agitação magnética, adicionou-se anidrido acético (39 mmol, 3,98 g, 3,7 mL). A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 h. Após, adicionou-se ao meio reacional água destilada gelada (20 mL) e solução aquosa de HCl 5% (V/V) (20 mL). A mistura foi transferida para um funil de separação e extraída com éter etílico (3 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com água destilada (5 x 20 mL), solução de NaOH 1 mol L⁻¹ (2 x 20 mL) e novamente água (5 x 20 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, após filtração o solvente foi eliminado à pressão reduzida. Quando necessário os produtos das reações foram purificados por cromatografia em coluna utilizando mistura dos solventes hexano-acetato de etila (9:1).

Acetato de Timoila, **3a** (acetato de 2-isopropil-5-metilfenila).



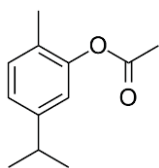
Rendimento: 85%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7,20 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,02 (dd, J = 7,9; 1,1 Hz, 1H), 6,81 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 2,97 (hept, J = 6,9 Hz, 1H), 2,31 (s, 6H), 1,19 (d, J = 6,9 Hz, 6H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 169,7; 147,9; 137,0; 136,5; 127,1; 126,4; 122,7; 27,1; 23,0; 20,9; 20,8.

CG-EM (m/z): 192,1 (11,18%), 150,1 (50,55%), 136,1 (15,16%), 135,1 (100,00%), 115,1 (8,96%), 107,1 (8,47%), 91,1 (13,01%).

Acetato de Carvacrila, **4a** (acetato de 5-isopropil-2-metilfenila).



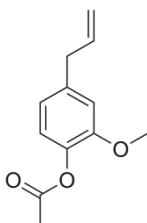
Rendimento: 98%

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,14 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,01 (dd, $J = 7,8$; 1,6 Hz, 1H), 6,86 (d, $J = 1,3$ Hz, 1H), 2,87 (hept, $J = 6,9$ Hz, 1H), 2,31 (s, 3H), 2,13 (s, 3H), 1,23 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 169,3; 149,2; 148,0; 130,8; 127,1; 124,18; 119,7; 33,5; 23,8; 20,8; 15,7.

CG-EM (m/z): 192,10 (13,65%), 151,10 (11,27%), 150,10 (88,05%), 136,10 (16,40%), 135,10 (100,00%), 91,05 (15,50%), 107,10 (12,66%), 77,05 (7,18%).

Acetato de Eugenila, **1a** (acetato de 4-alil-2-metoxifenila).



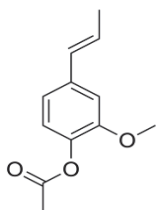
Rendimento: 90%

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6,95 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,81 – 6,72 (m, 2H), 5,96 (ddt, $J = 17,0$; 10,2; 6,7 Hz, 1H), 5,18 – 5,4 (m, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,38 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,31 (s, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 169,3; 150,7; 139,0; 137,8; 137,0; 122,4; 120,6; 116,1; 112,6; 55,7; 40,0; 20,7.

CG-EM (m/z): 206,00 (4,24%), 164,00 (84,18), 149,00 (35,12%), 104,00 (34,51%), 103,00 (39,67%), 90,95 (65,79%), 77,00 (62,49), 55,00 (35,02%), 42,95 (100,00%).

Acetato de Isoeugenila, **2a** (acetato de (*E*)-2-metoxi-4-(prop-1-en-1-il)fenila).



Rendimento: 85%

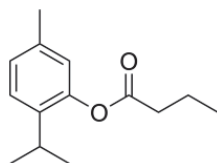
RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 6,98 – 6,86 (m, 3H), 6,43 – 6,31 (m, 1H), 6,18 (dq, $J = 15,7$; 6,2 Hz, 1H), 3,84 (s, 3H), 2,31 (s, 3H), 1,88 (dd, $J = 6,3$; 1,2 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 169,2; 150,9; 138,4; 137,0; 130,4; 126,1; 122,6; 118,3; 109,5; 55,7; 20,7; 18,4.

CG-EM (m/z): 206,10 (0,32%), 103,00 (13,08%), 91,00 (37,22%), 77,00 (31,64%), 65,00 (24,63%), 63,00 (14,32%), 55,00 (24,08%), 51,00 (18,40%), 43,00 (100,00%).

3.1.2 Procedimento Geral para a preparação dos ésteres butíricos de Timol e Carvacrol.

De acordo com metodologia descrita por Martin e Demerseman (1989), adicionou-se em um balão de 100 mL acoplado a um sistema de refluxo e atmosfera de Ar, o composto fenólico (23 mmol) e piridina (57,5 mmol, 4,54 g, 4,63 mL). Após 5 min de agitação, adicionou-se anidrido butírico (34,5 mmol, 5,45 g, 5,24 mL) ao meio reacional e agitou-se a mistura em temperatura de refluxo (120 °C) por 4 h. Logo após, deixou-se a temperatura do banho do óleo diminuir a cerca de 80 °C e adicionou-se água destilada, elevou-se a temperatura novamente deixando o sistema em refluxo por mais 30 min. Após resfriamento do sistema adicionou-se de éter etílico (60 mL). A mistura foi transferida para funil de separação. A fase orgânica foi separada e lavada com água destilada (4 x 15 mL), seguida de solução de H_2SO_4 1 mol L^{-1} (4 x 15 mL), água destilada (2 x 15 mL), solução de NaOH 2 mol L^{-1} (2 x 15 mL), água destilada (4 x 15 mL), por fim a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro. Após filtração o solvente foi eliminado à pressão reduzida. Não houve necessidade de posterior purificação dos produtos.

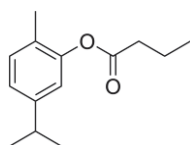
Butirato de Timoila, **3b** (butirato de 2-isopropil-5-metilfenila)

Rendimento = 91%

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,20 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,06 – 6,97 (m, 1H), 6,80 (d, $J = 0,7$ Hz, 1H), 2,96 (hept, $J = 6,9$ Hz, 1H), 2,56 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,31 (s, 3H), 1,81 (sex, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,19 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H), 1,06 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 172,4; 147,8; 137,0; 136,5; 127,0; 126,3; 122,7; 36,2; 27,0; 23,0; 20,8; 18,5; 13,7.

CG-EM (m/z): 220,15 (14,40%), 151,10 (10,29%), 150,10 (82,56%), 136,10 (19,09%), 135,10 (100,00%), 115,05 (7,79%), 91,05 (12,16%), 71,05 (11,12%).

Butirato de Carvacrila, **4b** (butirato de 5-isopropil-2-metilfenila)

Rendimento = 96%

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,14 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,00 (dd, $J = 7,8$; 1,6 Hz, 1H), 6,85 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 2,85 (hept, $J = 6,9$ Hz, 1H), 2,56 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,13 (s, 3H), 1,79 (sex, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,23 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H), 1,06 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 171,9; 149,3; 148,0; 130,8; 127,1; 124,0; 119,8; 36,1; 33,5; 23,9; 18,6; 15,8; 13,7.

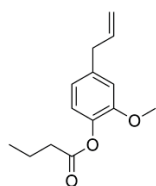
CG-EM (m/z): 220,15 (13,63%), 151,10 (14,66%), 150,10 (97,41%), 136,10 (14,81%), 135,10 (100,00%), 91,05 (11,78%).

3.1.3 Procedimento Geral para a preparação dos ésteres butíricos de Eugenol e Isoeugenol.

Baseando-se na metodologia descrita por De Moraes et al. (2014), em um balão de 100 mL, sob atmosfera de Ar, adicionou-se o composto fenólico (21 mmol) e piridina (53 mol, 4,22 g, 4,3 mL). Após 5 min de agitação adicionou-se anidrido butírico (32 mmol, 5,7 g, 5,24 mL), a mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 h. Logo após, adicionou-se ao meio reacional água destilada gelada (20 mL) e solução aquosa de HCl 5% (V/V) (20 mL). A mistura foi transferida para um funil de separação e extraída com éter dietílico (20 mL). A fase orgânica foi separada e lavada com água destilada (5 x 20 mL), solução de NaOH 1 mol

L⁻¹ (2 x 20 mL) e novamente água (5 x 20 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, após filtração o solvente foi eliminado à pressão reduzida. Os produtos das reações foram purificados por cromatografia em coluna, utilizando mistura dos solventes hexano-acetona (8:2), respectivamente.

Butirato de Eugenila, **1b** (butirato de 4-alil-2-metoxifenila)



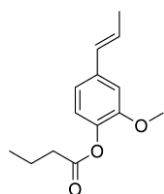
Rendimento = 67%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 6,97 – 6,88 (m, 1H), 6,81 – 6,71 (m, 2H), 6,08 – 5,82 (m, 1H), 5,18 – 5,03 (m, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,38 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H), 2,56 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,79 (sex, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,05 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 171,9; 150,8; 138,8; 138,7; 137,0; 122,5; 120,6; 116,1; 112,6; 55,7; 40,0; 35,8; 18,5; 13,5.

CG-EM (m/z): 234,00 (3,58%), 164,05 (100,00%), 149,00 (30,23%), 104,05 (23,40%), 103,05 (21,98%), 91,00 (40,08%), 77,00 (34,52%), 71,05 (32,80%), 43,05 (87,70%), 41,00 (40,13%).

Butirato de Isoeugenila, **2b** (butirato de (*E*)-2-metoxi-4-(prop-1-en-1-il)fenila).



RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7,05 – 6,84 (m, 3H), 6,44 – 6,30 (m, 1H), 6,18 (dq, *J* = 15,7; 6,3 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 2,55 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,88 (dd, *J* = 6,3, 1,2 Hz, 3H), 1,85 – 1,72 (m, 2H), 1,05 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H).

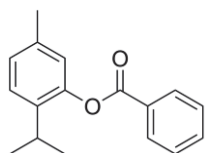
RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ 171,8; 151,0; 138,7; 136,9; 130,5; 125,9; 122,7; 118,4; 109,6; 55,7; 35,9; 18,5; 18,4; 13,59.

CG-EM (m/z): 234,05 (2,45%), 164,05 (100,00%), 149,05 (17,41%), 103,00 (12,53%), 91,00 (23,16%), 77,05 (15,04%), 55,00 (10,84%), 43,00 (44,75%), 41,00 (19,33%).

3.1.4 Procedimento Geral para a preparação dos ésteres benzílicos dos compostos fenólicos.

Baseando-se na metodologia descrita por De Moraes et al. (2014), em um balão de 100 mL, sob atmosfera de Ar, adicionou-se o composto fenólico (19 mmol) e piridina (29,4 mmol, 2,32 g, 2,36 mL). Após 5 min de agitação adicionou-se anidrido benzoico (29,4 mmol, 6,65 g), a mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 h. Logo após, adicionou-se ao meio reacional água destilada gelada (20 mL) e solução aquosa de HCl 5% (V/V) (20 mL). A mistura foi transferida para um funil de separação e extraída com éter etílico (20 mL). A fase orgânica foi lavada com água destilada (5 x 20 mL), solução de NaOH 1 mol L⁻¹ (2 x 20 mL) e novamente água (5 x 20 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, o solvente eliminado sob pressão reduzida. Os produtos das reações foram purificados por cromatografia em coluna utilizando, mistura dos solventes hexano-acetona (8:2), ou hexano-acetato de etila (8:2), respectivamente.

Benzoato de Timoila, **3c** (benzoato de 2-isopropil-5-metilfenila)



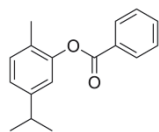
Rendimento: 37%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8,22 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H), 7,65 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,52 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 7,25 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,06 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,95 (s, 1H), 3,06 (hept, *J* = 6,9 Hz, 1H), 2,4 (s, 3H), 1,21 (d, *J* = 6,9 Hz, 6H).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 165,3; 148,1; 137,2; 136,6; 133,5; 130,1; 129,7; 128,6; 127,1; 126,4; 122,8; 27,3; 23,0; 20,8.

CG-EM (m/z): 254,05 (2,82%), 149,05 (9,96%), 106,05 (7,62%), 105,05 (100,00%), 91,00 (5,15%), 78,00 (4,74%), 77,00 (57,07%), 51,00 (6,25%).

Benzoato de Carvacrila, **4c** (benzoato de 5-isopropil-2-metilfenila)



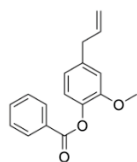
Rendimento: 51%

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 8,28 – 8,18 (m, 2H), 7,72 – 7,58 (m, 1H), 7,58 – 7,45 (m, 2H), 7,20 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,06 (dd, $J = 7,8$; 1,6 Hz, 1H), 7,00 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H), 2,91 (hept, $J = 6,9$ Hz, 1H), 2,19 (s, 3H), 1,25 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 164,9; 149,4; 148,1; 133,5; 130,9; 130,1; 129,62; 128,5; 127,3; 124,2; 119,8; 33,6; 23,9; 15,8.

CG-EM (m/z): 254,10 (0,46%), 106,05 (6,07%), 105,00 (68,26%), 91,05 (10,43%), 79,00 (5,39%), 78,00 (8,94%), 77,00 (100,00%), 51,05 (17,75%).

Benzoato de Eugenila, **1c** (benzoato de 4-alil-2-metoxifenila)



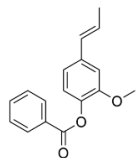
Rendimento: 94%

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,69 – 7,57 (m, 1H), 7,56 – 7,44 (m, 2H), 7,07 (dd, $J = 7,4$; 0,8 Hz, 1H), 6,85 – 6,78 (m, 2H), 5,99 (ddt, $J = 16,9$; 10,2; 6,7 Hz, 1H), 5,21 – 5,04 (m, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,41 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3): δ 164,9; 151,0; 139,0; 138,1; 137,1; 133,4; 130,2; 129,4; 128,4; 122,6; 120,7; 116,1; 112,7; 55,8; 40,1.

CG-EM (m/z): 268,05 (0,79%), 106,00 (7,61%), 105,00 (100,00%), 91,00 (9,96%), 78,00 (7,14%), 77,00 (78,95%), 65,05 (5,90%), 51,00 (19,08%), 41,00 (4,93%).

Benzoato de Ioeugenila, **2c** (Benzoato de (*E*)-2-metoxi-4-(prop-1-en-1-il)fenila)



RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 8,27 – 8,15 (m, 2H), 7,68 – 7,58 (m, 1H), 7,56 – 7,45 (m, 2H), 7,07 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,00 – 6,90 (m, 2H), 6,41 (dd, $J = 15,8$, 1,1 Hz, 1H), 6,21 (dq, $J = 15,7$, 6,2 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H), 1,89 (dd, $J = 6,3$, 1,2 Hz, 3H).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ 164,8; 151,2; 138,8; 137,1; 133,4; 130,5; 130,3; 129,5; 128,5; 126,0; 122,8; 118,4; 109,8; 55,8; 18,4.

CG-EM (m/z): 268,10 (13,24%), 106,10 (8,15%), 105,10 (100,0%), 91,05 (4,15%), 77,05 (28,23%).

3.2 Testes biológicos

Para testar a atividade biológica dos compostos precursores e seus derivados, foram escolhidas duas espécies de fungos, *Colletotrichum nymphaeae* (Ca32) e *Colletotrichum fructicola* (Col33), da coleção de fungos do LEMID, os quais são os mais ocorrentes no Brasil causando doenças em folhas de macieira.

Os experimentos para avaliar a atividade dos compostos foram: teste da inibição do crescimento micelial, concentração inibitória mínima e teste *ex vivo* em folhas destacadas de macieira do cultivar Gala.

3.2.1 Teste de inibição do crescimento micelial

Os fungos fitopatogênicos da coleção LEMID (*Colletotrichum nymphaeae* isolado Ca32 e *Colletotrichum fructicola* isolado Col33) foram transferidos para meio de cultura, batata dextrose-água (BDA), sob incubação a 23°C com fotoperíodo de 12 h, durante 96 h, para obter colônias jovens e ativas.

Utilizou-se para o teste de crescimento micelial a técnica da comida envenenada descrita por Grover e Moore (1962). Nesta técnica, os compostos testados foram previamente preparados em soluções estoque de concentração conhecida. Como solvente foi utilizado o sulfóxido de metila (DMSO), e para auxiliar na posterior suspensão do composto no meio de cultura utilizou-se o surfactante [®]Adyvex. Uma alíquota da solução estoque foi então adicionada em 40 mL de meio BDA líquido esterilizado, de modo a obter a concentração final de interesse. O meio BDA carregando o composto na concentração previamente estipulada (25, 50, 75, 100, 125, 200, 300, 600, 800, 1000, 1200 ou 1400 mg·L⁻¹) foi vertido em placas de Petri, deixando-o solidificar à temperatura ambiente. Sequencialmente, um disco de micélio de 5 mm, de ambas as espécies de fungos, foi retirado da borda da colônia com 96 h de incubação, e depositada sobre outra placa com BDA contendo o composto a ser testado. Placas de Petri contendo apenas BDA foram tratadas como testemunha. Placas com BDA mais solvente e surfactante (1,5 mL e 7μL, respectivamente), foram utilizadas como controle. Também como controle, utilizou-se placas contendo o fungicida tiofanato metílico obtido comercialmente como [®]Cercobin 700wp na concentração de 1 mg·L⁻¹.

As placas foram incubadas à temperatura de 23,5 °C e fotoperíodo de 12 h. Os diâmetros das colônias foram medidos quando a massa micelial nas placas de Petri da testemunha quase a preenchia (aproximadamente 72 h). A porcentagem de inibição causada pelo tratamento foi calculada a partir da seguinte fórmula.

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{d - D}{d} \right) \cdot 100$$

Em que: d = diâmetro da colônia testemunha; D = diâmetro da colônia no tratamento

Todos os compostos e suas respectivas concentrações foram testadas em quadruplicata.

3.2.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

Os fungos fitopatogênicos da coleção LEMID (*Colletotricum nymphaeae* isolado Ca32 e *Colletotrichum fructicola* isolado Col33) foram transferidos para meio de cultura, contendo aveia (10%) e BDA (1,5%) e mantidos sob incubação a 23°C com fotoperíodo de 12 h, durante 168 h, para obter colônias na fase de esporulação.

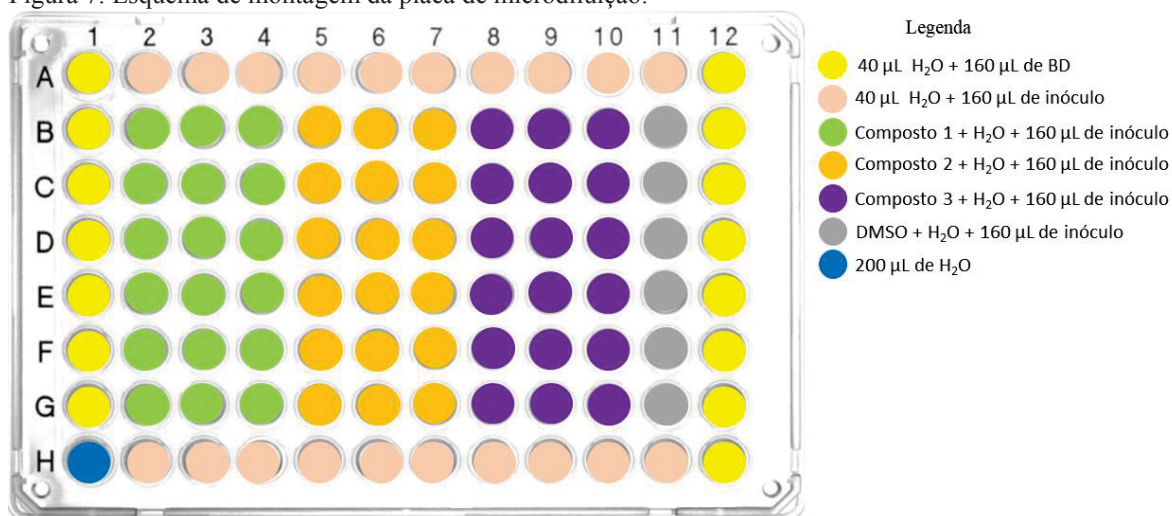
Para a realização deste teste utilizou-se o método da microdiluição em caldo, conforme protocolo padronizado pela NCCLS (2002), com adaptações. Os compostos testados foram previamente preparados em soluções estoque de concentração conhecida, utilizando-se como solvente o DMSO.

Adicionou-se em placa de microdiluição de 96 poços, como controle negativo (Figura 7), 160 µL de meio de cultura caldo de batata-dextrose (BD). Como controle positivo, adicionou-se 160 µL meio de cultura BD (Figura 7), contendo os fungos testados (inoculo) na concentração de 10⁵ conídios/mL.

Os compostos a serem testados como agentes antifúngicos, foram adicionados nas placas de microdiluição em um gradiente de 6 concentrações (Figura 7), iniciando da menor para a maior concentração, em triplicata. O gradiente de concentração foi obtido adicionando-se uma alíquota da solução estoque de cada composto, de maneira a se obter a concentração final de teste (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 425, 550, 600, 675, 800, 1000, 1200 ou 1400 mg · L⁻¹). Poços contendo apenas DMSO (Figura 7), foram preparados com as quantidades utilizadas durante o teste (2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5% e 15%). Também foram adicionados em todos os poços contendo os compostos, 160 µL meio de cultura BD, com inoculo. Água esterilizada foi adicionada em todos os poços da placa para completar o volume final de 200 µL.

Utilizou-se também como controle, o fungicida comercial Manzate-800®, nas concentrações de 0,0016, 0,08, 0,4, 2, 10 e 50 mg · L⁻¹ do princípio ativo (mancozebe), realizada em triplicata.

Figura 7. Esquema de montagem da placa de microdiluição.



Fonte: Imagem adaptada de <http://www.directindustry.it/prod/ependorf/product-22548-1606927.html>

As placas de microdiluição foram incubadas a 23 °C com foto período de 12 h. A densidade ótica (DO) das placas de microdiluição foram acompanhadas no Centro de Diagnósticos Marcos Enrietti, utilizando um espectrofotômetro de placas de microdiluição (Bio Tek, modelo Elx 800 GIDX, 5 a 96 poços) com filtro de 405 nm. Foram realizadas leituras, com 24h e 168h de incubação.

A avaliação da CIM foi realizada, comparando a DO dos poços contendo os compostos testados com a DO dos controles. Em que, os poços com DO semelhante ao apresentado pelo controle negativo, indica não haver ocorrido atividade biológica. Poços com DO's maiores que o apresentado pelo controle negativo, indicam atividade biológica. A CIM foi obtida, considerando-se o valor encontrado na concentração anterior ao primeiro poço da placa em que houve viabilidade fúngicas.

O procedimento descrito acima, foi utilizado em dois testes da concentração inibitória mínima, realizados de maneira independente.

3.2.3 Teste *ex vivo*

Os fungos fitopatogênicos da coleção LEMID (*Colletotricum nymphaeae* isolado Ca32 e *Colletotrichum fructicola* isolado Col33) foram transferidos para meio de cultura, contendo aveia (10%) e BDA (1,5%), sob incubação a 23°C com fotoperíodo de 12 h, durante 168 h, para obter colônias na fase de esporulação.

Os compostos a serem testados foram pesados e dissolvidos em 1 mL de DMSO e para auxiliar na posterior suspensão dos compostos em meio aquoso utilizou-se o surfactante [®]Adyvex. Os tubos eppendorfs contendo os compostos previamente preparados, foram

adicionados em vasilhames contendo 100 mL de água, de modo a se obter a concentração final dos tratamentos (125, 200 e 600 mg · L⁻¹). Como testemunha, utilizou-se apenas água como um dos tratamentos. Preparou-se uma solução de DMSO 1% como tratamento controle. Também foi preparado um tratamento contendo a dose de campo de Manzate-800® (200g/100L de água), recomendada para controle da MFG (UPL DO BRASIL INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE INSUMOS AGROPECUÁRIOS S.A.).

As folhas de macieira foram destacadas de mudas cultivadas em câmara de crescimento. As folhas foram mergulhadas em três vasilhames contendo apenas água durante 1 min cada, afim de retirar algum possível resíduo superficial. Logo após, as folhas foram mergulhadas nas suspensões dos tratamentos durante 30 s e então acondicionadas em câmeras úmidas (

Figura 8a, 8b e 8c), que por sua vez foram alocadas em sala climatizada para experimentos *ex vivo*. O experimento foi realizado em quintuplicata.

Figura 8. Etapas da montagem do experimento *ex vivo*, a) tratamento das folhas, b) acomodação em caixa plástica gerbox, c) montagem da câmara úmida, d) inoculação das folhas e e) inóculo depositado sobre as folhas.



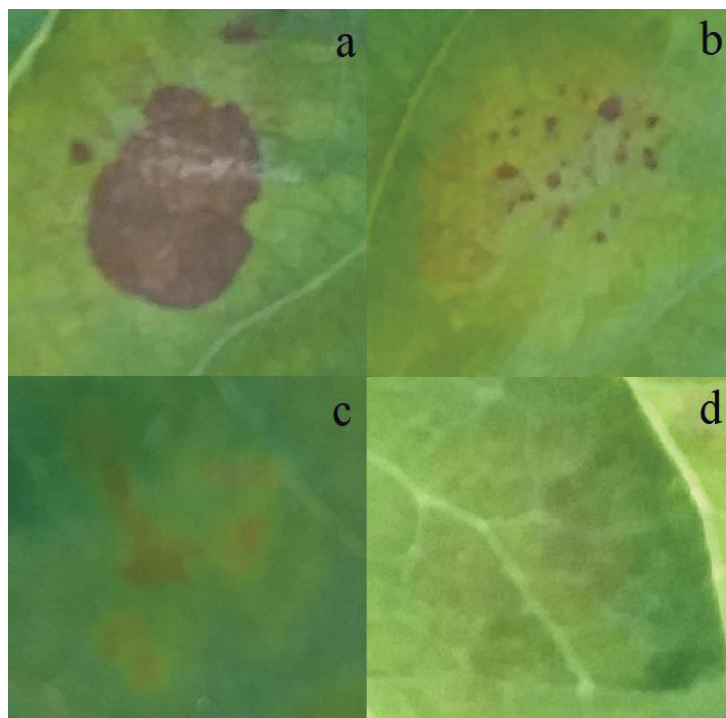
Para inoculação das folhas, as suspensões de esporos, foram ajustadas para 10⁴ conídios/mL, adicionou-se uma gota de tween 20 para auxiliar na suspensão dos esporos. Sobre cada folha do teste, foram depositadas 4 gotas de 20 µL, da suspensão de esporos, uma em cada quadrante imaginário da folha (Figura 8d e 8e).

A avaliação do experimento foi realizada, observando a presença ou a ausência de sintomas da MFG em cada um dos pontos de inoculação em cada uma das folhas, nos dias 1º ao 9º e no 14º dia transcorridos do momento da inoculação das folhas. Ao final, considerando-se como 100% de controle, os tratamentos nos quais nenhum dos 20 pontos de inoculação

apresentarem sintomas, pôde-se estimar a porcentagem de controle da MFG dos tratamentos no experimento.

No 8º dia de teste, todas as lesões causadas pela doença em cada uma das folhas foram avaliadas individualmente. Para tal, criou-se uma escala de severidade para cada sintoma. Os sintomas mais avançados de MFG aparecem como uma região da folha totalmente necrosada (necrose total), um sintoma menos severo aparece como pequenas pontuações necróticas na superfície da folha (pontuação necrótica), uma terceira escala de sintoma seria o aparecimento de uma mancha esverdeada na folha (clorose), indicando alguma alteração nesta região, por último a ausência de sintomas (sem sintoma). A Figura 9 melhor exemplifica as escalas de severidade de cada sintoma da doença.

Figura 9. Severidade dos sintomas apresentados pela MFG, em que, a) necrose total, b) pontuações necróticas, c) e d) clorose.



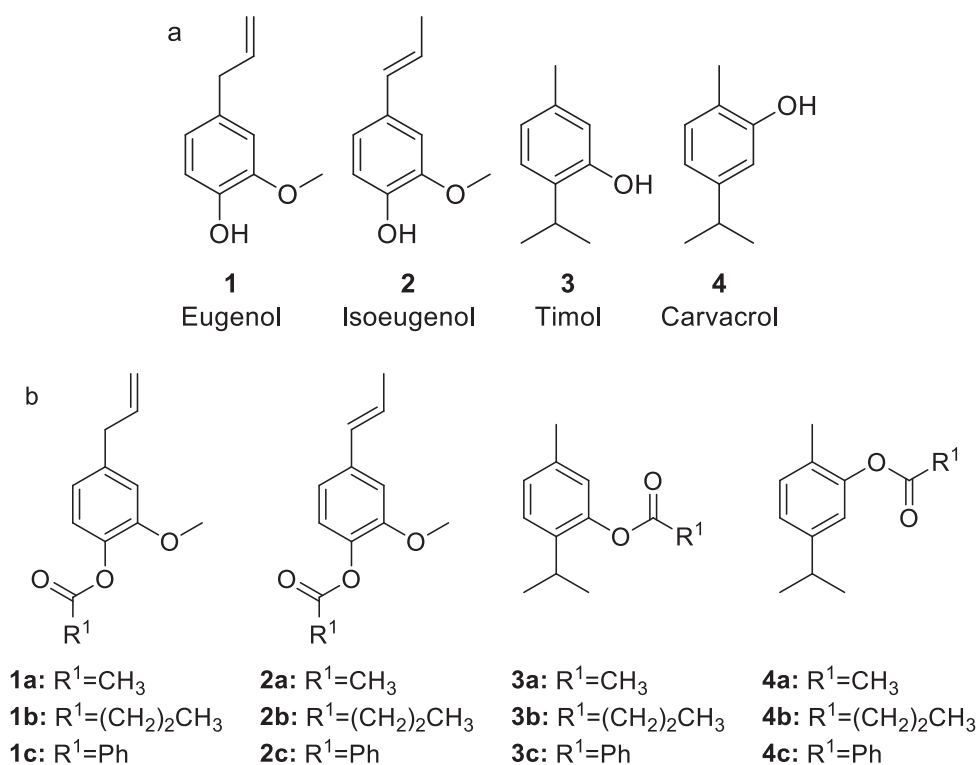
Considerando o total de 20 pontos de inoculação, estipulou-se o percentual que cada tipo de sintoma representa dentro da totalidade de pontos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados preliminares obtidos por nosso grupo de pesquisa (Krasniak, 2015 e Garcia, 2017) mostraram que eugenol, isoeugenol e seus respectivos acetatos apresentaram boa atividade para o controle do fungo *Monilinia fructicola*, importante praga na cultura de pêssegos. De posse desses resultados resolveu-se preparar uma série de derivados de algumas substâncias fenólicas, a saber, eugenol, isoeugenol, timol e carvacrol e testar essas substâncias, bem como seus derivados, contra os patógenos de macieira *Colletotrichum fructicola* e *Colletotrichum nymphaeae*, responsáveis por importantes doenças observadas na cultura da maçã.

Na Figura 10, estão apresentadas as estruturas químicas dos compostos fenólicos selecionados e modificados para o teste realizado com duas espécies do gênero *Colletotrichum*.

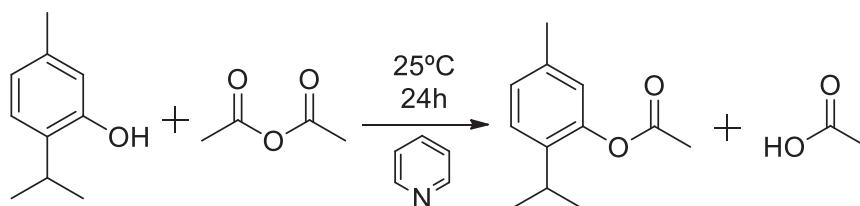
Figura 10. Estruturas químicas dos a) compostos fenólicos selecionados para teste. b) Propostas de modificações estruturais nas substâncias fenólicas.



4.1 Acetatos derivados das substâncias fenólicas

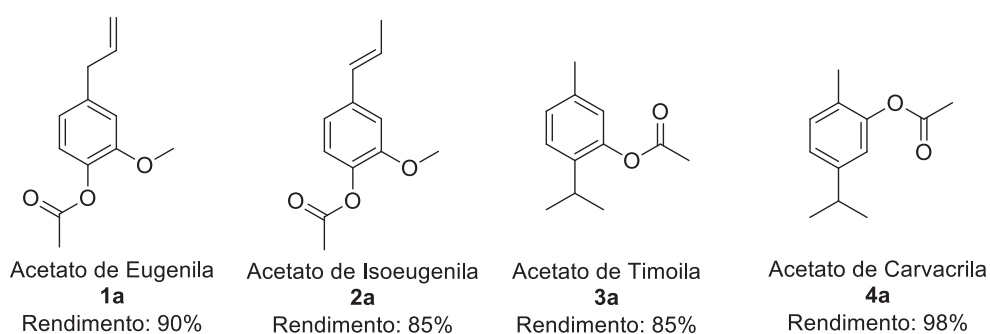
Os quatro acetatos derivados das substâncias fenólicas, foram preparados empregando as mesmas condições reacionais, conforme Equação 1.

Equação 1. Condições reacionais para preparação dos derivados de acetato, utilizando timol como referência.



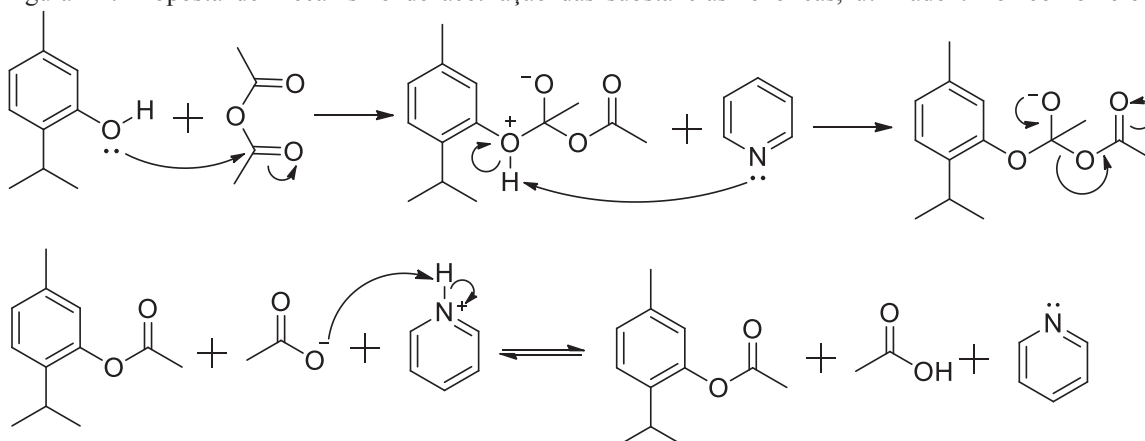
A Figura 11 ilustra os produtos das reações de obtenção dos acetatos derivados das substâncias fenólicas, bem como os respectivos rendimentos obtidos.

Figura 11. Derivados acetilados dos compostos fenólicos e rendimentos das suas obtenções.



A proposta de mecanismo de acetilação destas substâncias fenólicas é apresentada na Figura 12, onde utiliza-se o timol como referência, os demais mecanismos de acetilação são essencialmente os mesmos, trocando apenas o correspondente composto fenólico.

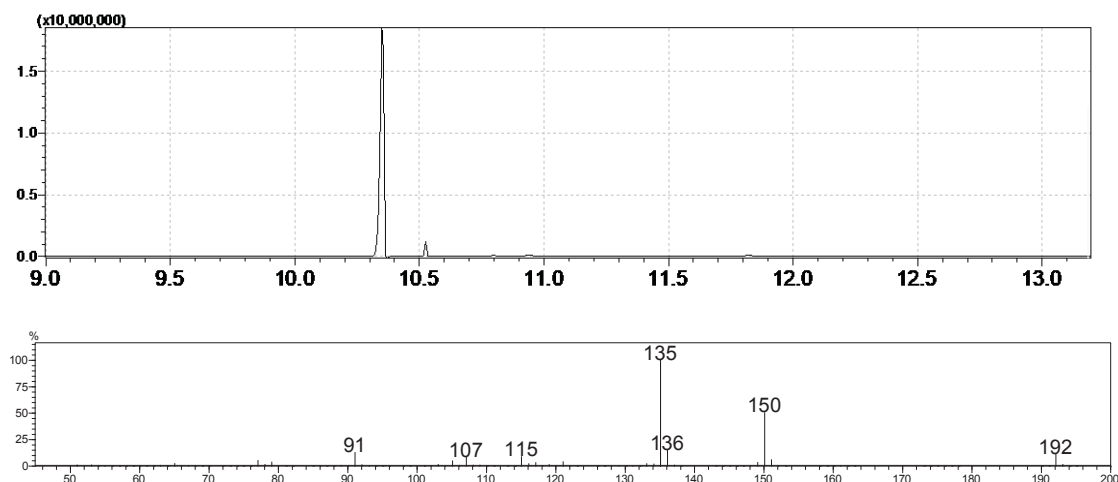
Figura 12. Proposta de mecanismo de acetilação das substâncias fenólicas, utilizado timol como referência.



Será apresentada a seguir uma discussão apenas envolvendo a caracterização do acetato de timoila (composto **3a**), afim de ilustrar como essas substâncias foram caracterizadas, os demais espectros de RMN de ^1H estão disponíveis em **ANEXO 2**.

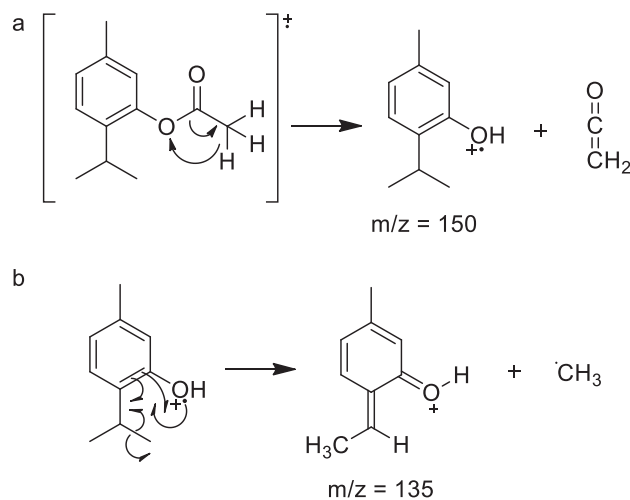
O material obtido da reação de formação do composto **3a** foi submetido à análise cromatográfica e posterior espectrometria de massas.

Figura 13. Cromatograma do produto da reação de formação de **3a** e fragmentos de massas do produto majoritário.



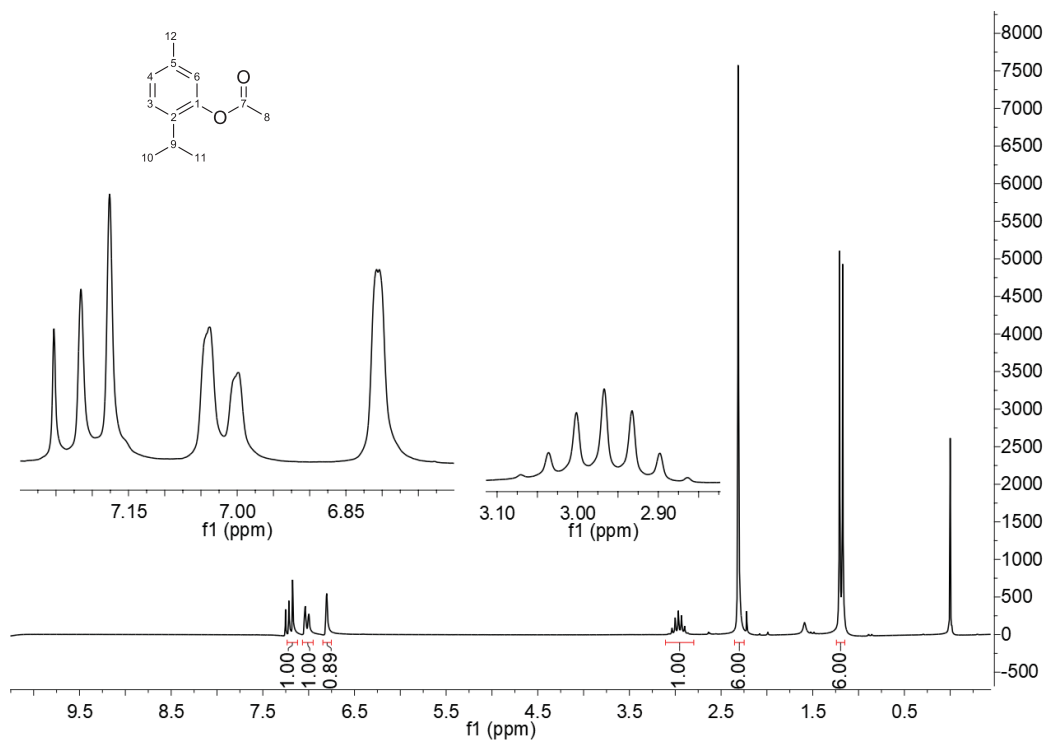
O cromatograma (Figura 13) apresenta dois picos, um de maior intensidade e outro de baixa intensidade identificado como sendo resultado do processo de sangria da coluna por ser substância sililada. O pico majoritário apresenta um fragmento com relação massa/carga (m/z) = 192 u.m.a, correspondendo a massa molecular do **3a**, portanto seu íon molecular $[M]^+$. Possui também como um dos principais íons fragmentos um pico com m/z = 150 u.m.a. e intensidade de 50,55%, tendo como proposta de fragmentação, a passagem por um mecanismo de fragmentação comum para ésteres, em que ocorre um rearranjo para eliminar uma molécula neutra de ceteno correspondente, como proposto na Figura 14a. O pico base corresponde ao íon fragmento de m/z = 135 u.m.a., resultado de uma subsequente perda de radical metila, a partir do íon fragmento com m/z = 150 u.m.a. (Figura 14b). A partir do fragmento correspondente ao pico base, pode-se propor uma contração de anel, com perda de monóxido de carbono, para gerar o íon fragmento com m/z = 107 u.m.a (PAVIA, et al., 2010).

Figura 14. a) Proposta de fragmentação via rearranjo com eliminação de ceteno. b) subsequente perda de radical metila.



O material obtido da reação de formação do composto **3a** também foi submetido à Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e de Carbono (RMN de ^{13}C), os espectros adquiridos estão representados na Figura 15 e Figura 16.

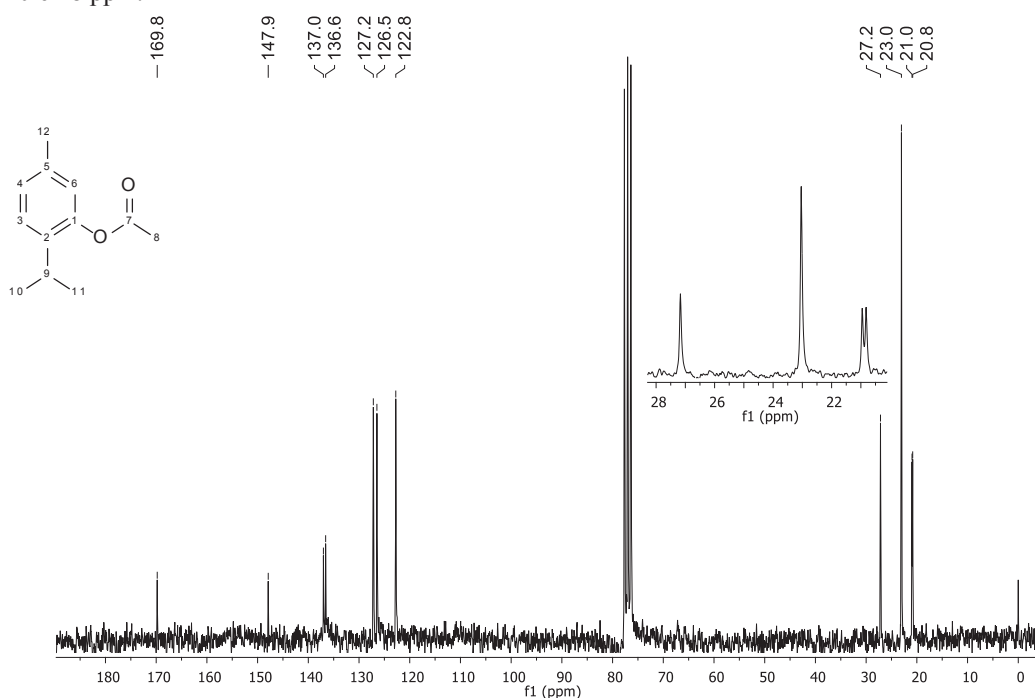
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto **3a**, com expansão da região entre 6,7 e 7,3 ppm e estrutura numerada.



O espectro de RMN de ^1H , da substância **3a** apresentou um sinal com deslocamento químico (δ_{H}) de 1,19 ppm, sendo um duplete com integral para 6 hidrogênios, referente aos

hidrogênios das metilas de C10 e C11 (Figura 15). Os hidrogênios das posições H10 e H11 estão acoplando com o hidrogênio isopropílico (H9) com uma constante de acoplamento (J) de 6,9 Hz. O sinal referente ao hidrogênio isopropílico (H9) aparece com $\delta_H = 2,97$ ppm, sendo um hepteto, acoplando com os hidrogênios metílicos (H10 e H11), com $J = 6,9$ Hz, como esperado. O sinal em $\delta_H = 2,31$ ppm, sendo um simpleto com integral para 6 hidrogênios, refere-se a metila do grupo acetato e a metila ligada diretamente ao anel aromático (H8 e H12, respectivamente). Os sinais em $\delta_H = 6,81$, 7,02 e 7,20 ppm correspondem aos três hidrogênios aromáticos. O sinal em 6,81 ppm corresponde ao hidrogênio aromático H6, sendo ele um duplete, que acopla em *meta* com o H4, com $J = 1,1$ Hz. O sinal em 7,02 ppm corresponde ao H4, onde sua multiplicidade corresponde a um duplo duplete ($J = 7,9$ Hz; 1,1 Hz), pois percebe-se um início de desdobramento, que não é visível devido a sua pequena constante de acoplamento ($J = 1,1$ Hz para o acoplamento em *meta*) somada a falta de resolução do equipamento. O sinal em 7,20 ppm corresponde ao H3, sendo ele um duplete, que acopla em *orto* com o H4, com $J = 7,9$ Hz.

Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3) correspondente ao composto **3a**, com expansão da região entre 20 e 28 ppm.



O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 16), mostra sinais localizados na região de carbono sp^3 , sendo eles: carbono C8 com sinal em 20,8 ppm, C12 com sinal em 20,9 ppm, os C10 e C11 são equivalentes mostrando apenas um sinal em $\delta_C = 23,0$ ppm e o C9 em $\delta_C = 27,1$ ppm. Os sinais localizados na região de carbono sp^2 , com $\delta_C = 122,7 - 147,9$ ppm, correspondem aos

carbonos do anel aromático, em que os sinais de menor intensidade são C1, C2 e C5 (C1 ligado ao oxigênio do grupo éster), e os sinais de maior intensidade são C4, C3 e C6. O carbono do grupo carbonila apresenta um sinal em $\delta_C = 169,7$ ppm.

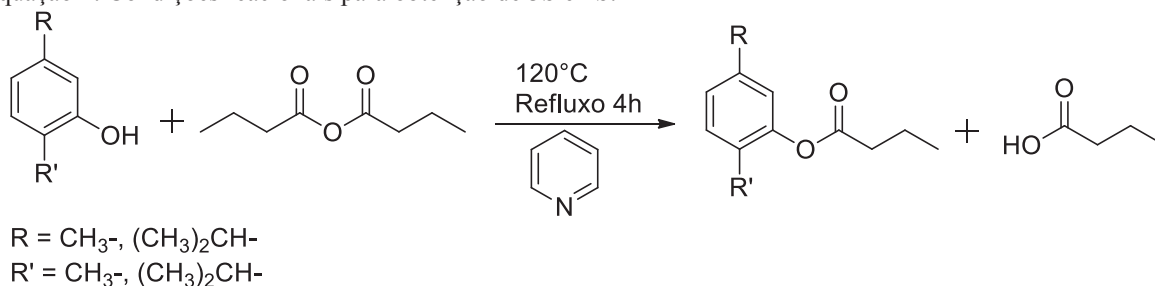
Desta forma os dados espectrais acima descritos, estão de acordo com a estrutura do acetato de timoila.

Os compostos acetilados, foram também submetidos aos mesmos processos de análise e podem ser caracterizados de forma semelhante ao que foi apresentado para **3a**.

4.2 Butiratos derivados das substâncias fenólicas

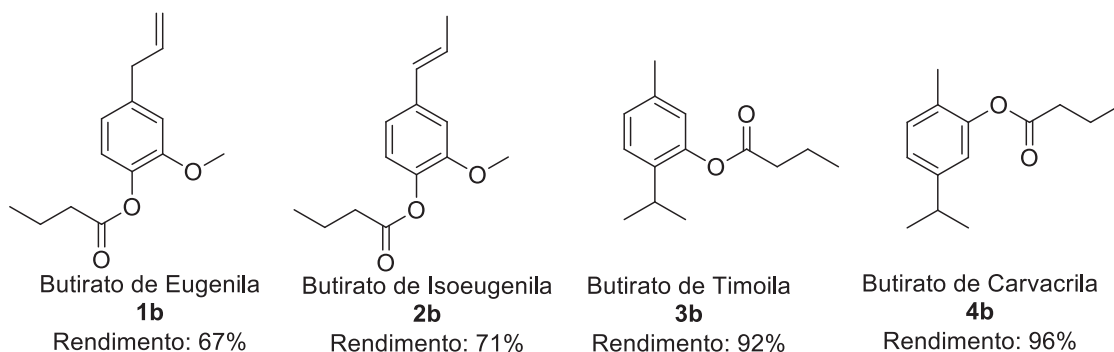
Os quatro butiratos derivados das substâncias fenólicas, foram preparados de duas formas distintas, como exposto na metodologia nas seções 3.1.2 e 3.1.3 (p. 35 e 36, respectivamente). A Equação 2 exibe as condições reacionais para obtenção dos compostos **3b** e **4b**. As condições reacionais para obtenção de **1b** e **2b** são as mesmas apresentadas na Equação 1 (p. 46), modificando apenas o agente acilante de anidrido acético para anidrido butírico.

Equação 2. Condições reacionais para obtenção de **3b** e **4b**.



A Figura 17, ilustra os produtos das reações de obtenção dos derivados butirados, bem como, os respectivos rendimentos obtidos.

Figura 17. Derivados butirados dos compostos fenólicos e rendimentos das suas obtenções.

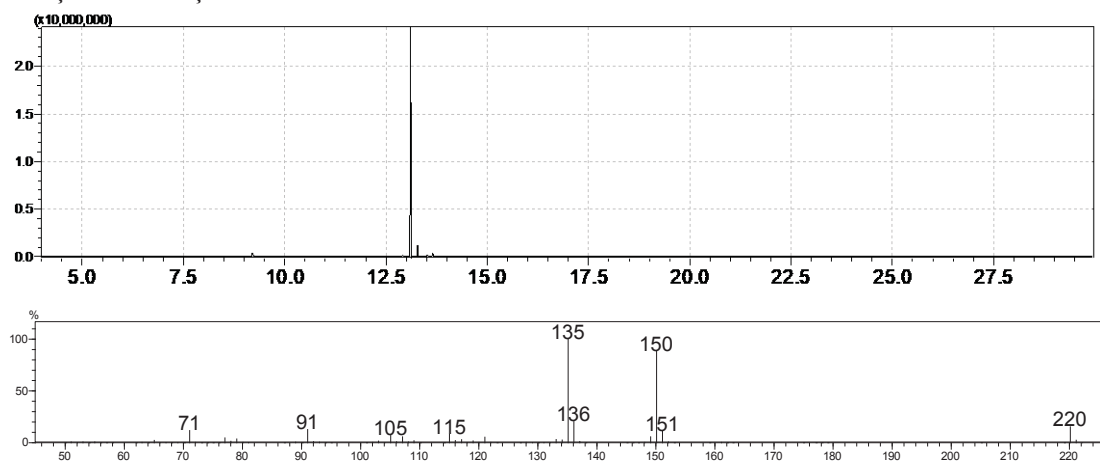


A proposta de mecanismo de formação dos ésteres butíricos destas substâncias fenólicas pode ser descrita da mesma forma como apresentada na Figura 12 (p. 46), apenas alterando o respectivo agente acilante.

Será apresentada a seguir uma discussão apenas envolvendo a caracterização do butirato de timoila (composto **3b**), afim de ilustrar como essas substâncias foram caracterizadas, os demais espectros de RMN de ^1H estão disponíveis em **ANEXO 2**.

O material obtido da reação de formação do composto **3b** foi submetido à análise de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

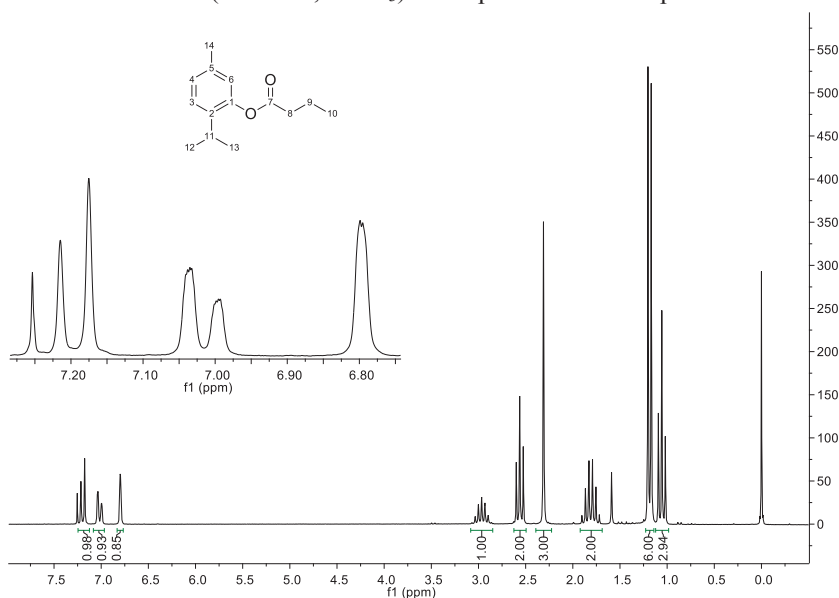
Figura 18. Cromatograma do produto da reação de formação de **3b** e fragmentos de massas do produto majoritário da reação de formação de **3b**.



O cromatograma da Figura 18, evidencia a presença de um pico majoritário. O espectro de massas obtido, apresenta um pico com m/z de 220 u.m.a. (14,40 %) que corresponde a massa molecular do composto **3b**. O padrão de fragmentação de massas obtido para este composto é bastante semelhante ao apresentado pelo composto **3a**. O pico com $m/z = 150$ u.m.a e intensidade de 88,64%, vem de rearranjo, com segmentação da ligação entre o carbono carbonílico e o oxigênio, eliminando uma molécula neutra do ceteno correspondente, semelhante ao mecanismo de fragmentação proposto na Figura 14a (p. 48). O pico base, origina-se da perda subsequente de radical metila (PAVIA, et al., 2010).

O material obtido da reação de formação do composto **3b** também foi submetido à análise de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , os espectros adquiridos estão representados na Figura 19 e Figura 20.

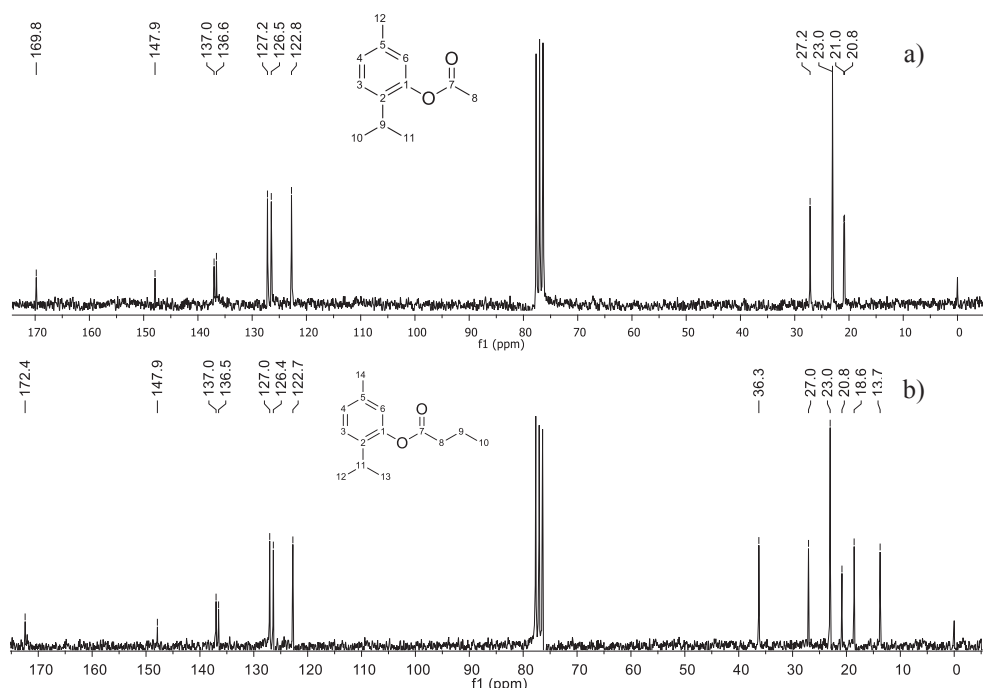
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3) correspondente ao composto **3b** e estrutura numerada.



Os sinais presentes nos RMN's de ^1H para os três derivados do timol, possuem similaridade em grande parte dos seus sinais, exceto pelos sinais oriundos da parte modificada da estrutura. Para o composto **3b**, os sinais que o distingue dos demais derivados do timol, aparecem na região de hidrogênios ligados a carbono sp^3 , com $\delta_{\text{H}} < 3,0$ ppm, referentes aos sinais gerados pelos hidrogênios correspondentes ao grupo butirato. O sinal que aparece em 1,06 ppm, sendo um triplete com integral para 3 hidrogênios, refere-se aos hidrogênios da posição H10, que acoplam com os hidrogênios vizinhos com $J = 7,4$ Hz. O sinal localizado em 1,81 ppm, corresponde aos H9, com multiplicidade de sexteto integrando para 2 hidrogênios e acoplando com cinco hidrogênios vicinais (H8 e H10) com $J = 7,4$ Hz, como esperado. Os H8 geram um triplete em 2,56 ppm com integral para 2 hidrogênio, onde acoplam com H9 com $J = 7,4$ Hz.

O espectro de RMN de ^{13}C para **3b**, apresenta 3 sinais diferenciados na região de carbonos sp^3 , que correspondem aos carbonos do grupo butirato, sendo eles: o sinal em 13,7 ppm, refere-se ao C10, o sinal em 18,5 ppm, corresponde ao C9 e o sinal em 36,2 ppm, é gerado por C8. Outra diferença que pode ser observada é o valor no deslocamento da metila do grupo acetato em **3a**, se comparada com a metila do grupo butirato em **3b**, devido ao fato da metila do grupo acetato estar ligada diretamente a carbonila, tornando-a mais desblindada ($\delta_{\text{H}} = 2,31$ ppm) se comparada à metila do grupo butirato ($\delta_{\text{H}} = 1,06$ ppm), que está ligada a um carbono sp^3 , tornando-a mais blindada comparativamente.

Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3) para a) **3a**, b) **3b**, com estrutura química numerada.



Diante da discussão exposta e as informações acumuladas, pode-se afirmar que o produto gerado da reação de obtenção de **3b**, corresponde ao butirato de timoíla.

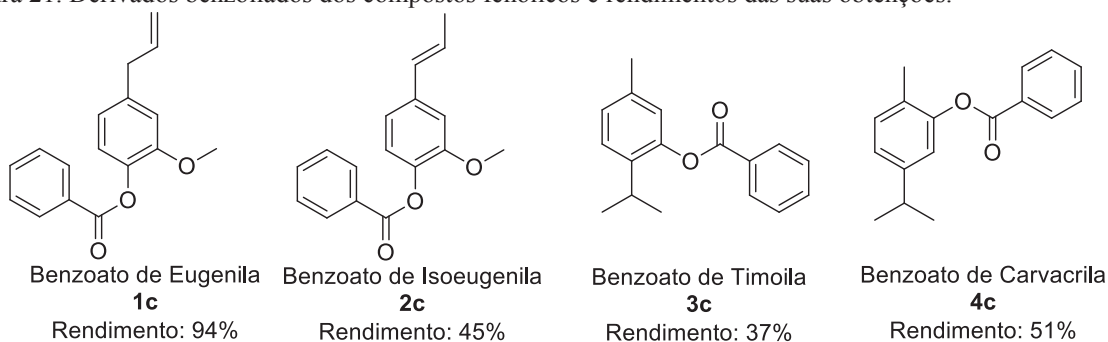
Os demais compostos butirados, foram também submetidos aos mesmos processos de análise e puderam ser caracterizados de forma semelhante ao que foi apresentado para **3b**.

4.3 Benzoatos derivados das substâncias fenólicas

Os quatro benzoatos derivados das substâncias fenólicas, foram sintetizados utilizando-se das mesmas condições reacionais apresentadas na Equação 1 (p. 46), modificando apenas o agente acilante de anidrido acético para anidrido benzóico.

A Figura 21, ilustra os produtos das reações de obtenção dos derivados benzoilados, bem como, os respectivos rendimentos obtidos.

Figura 21. Derivados benzoilados dos compostos fenólicos e rendimentos das suas obtenções.

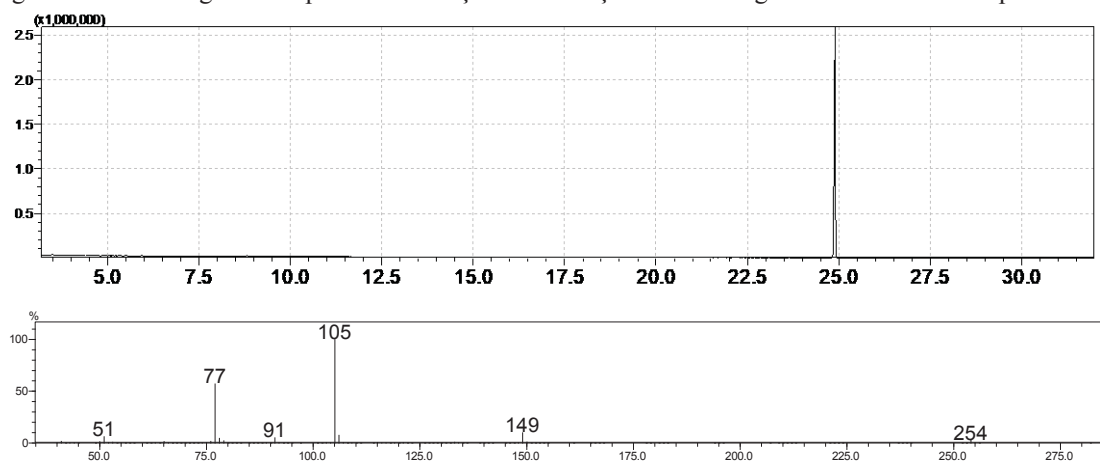


A proposta de mecanismo de benzoilação destas substâncias fenólicas pode ser descrita da mesma forma como apresentada na Figura 12 (p. 46), apenas alterando o respectivo agente acilante.

Será apresentada a seguir uma discussão apenas envolvendo a caracterização do benzoato de timoíla (composto **3c**), afim de ilustrar como essas substâncias foram caracterizadas, os demais espectros de RMN de ^1H estão disponíveis em **ANEXO 2**.

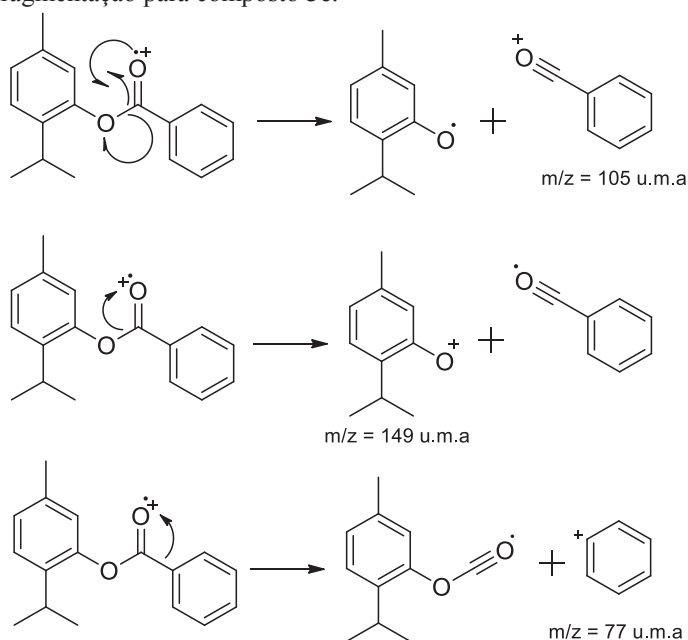
O material obtido da reação de formação do composto **3c** foi submetido à cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Figura 22. Cromatograma do produto da reação de formação de **3c** e fragmentos de massas do produto.



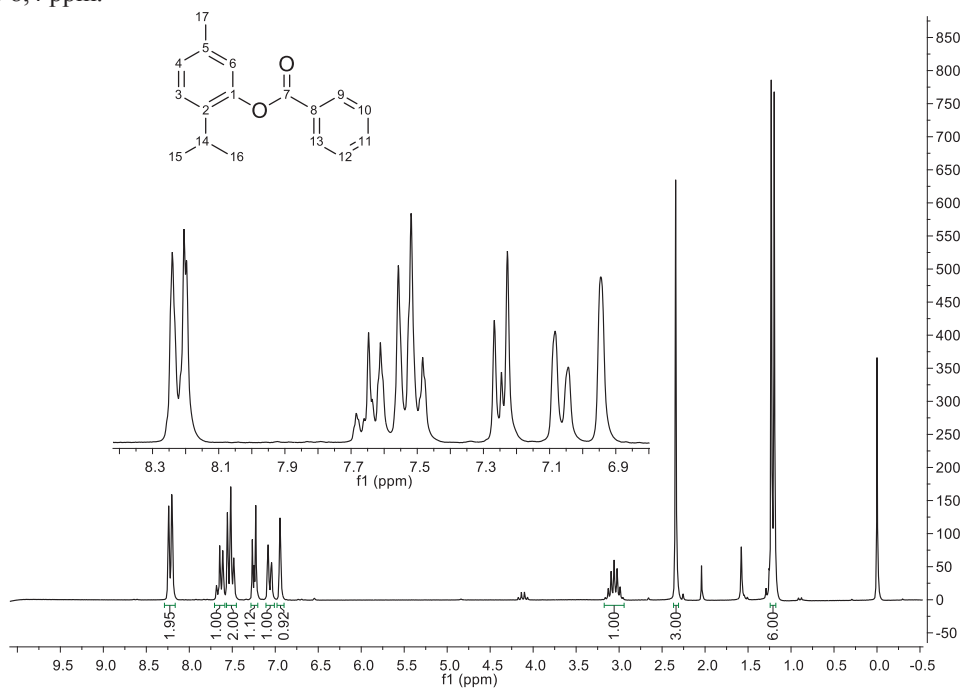
A Figura 22 mostra o cromatograma para o composto **3c** após purificação, onde nota-se que não há nenhum outro composto com concentração significativa presente no material. O $[\text{M}]^{+}$ corresponde ao pico com $m/z = 254$ u.m.a., correspondendo a massa molecular do composto **3c**. O íon fragmento correspondente ao pico base ($m/z = 105$ u.m.a), forma-se a partir da fragmentação α , que envolve a perda de radical alcoxi para formar o íon acílio correspondente, como exemplificado na Figura 23, sendo esta fragmentação característica de ésteres, bem como, a perda de íon alcóxila de 149 u.m.a. O pico em 77 u.m.a, refere-se ao íon fenila, resultado de segmentação na porção acílica do éster (PAVIA, et al., 2010).

Figura 23. Proposta de fragmentação para composto **3c**.



O material obtido da reação de formação do composto **3c** também foi submetido à análise de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , os espectros adquiridos estão representados na Figura 24 e Figura 25.

Figura 24. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3) correspondente ao composto **3c**, com expansão da região entre 6,8 e 8,4 ppm.

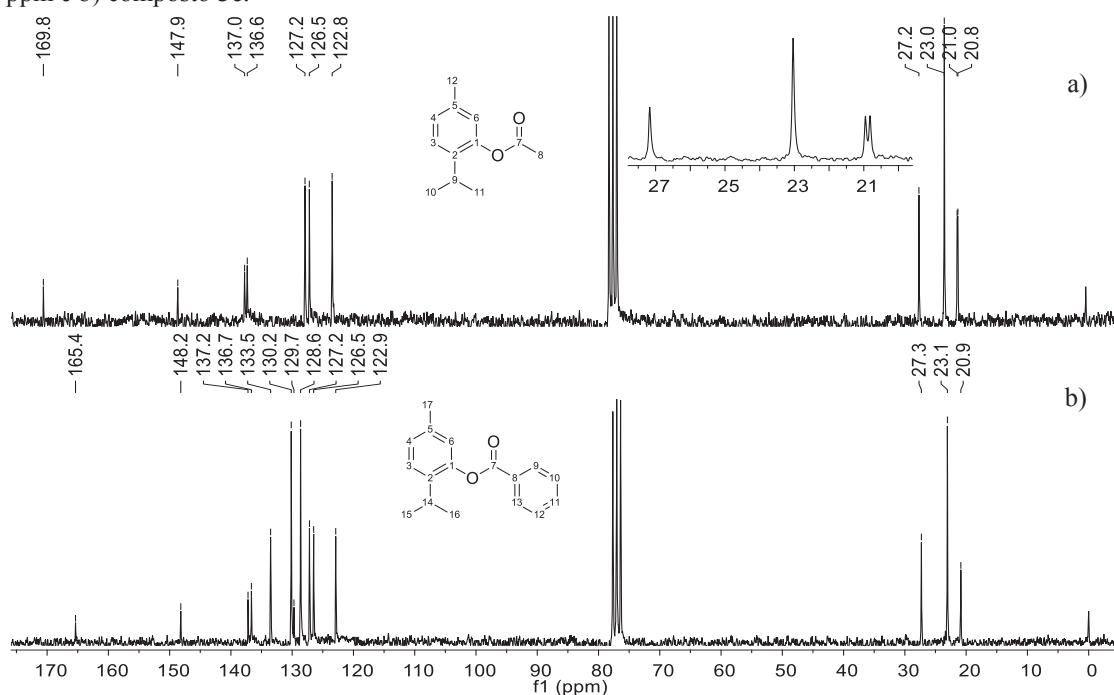


Os sinais presentes nos RMN's de ^1H para os três derivados do timol, possuem similaridade em grande parte dos seus sinais, exceto pelos sinais oriundos da parte modificada

da estrutura. Para o composto **3c**, os sinais que o distingue dos demais derivados do timol, aparecem na região de hidrogênios aromáticos, com $\delta_H > 7,4$ ppm, referentes aos sinais dos hidrogênios do grupo benzoato. O sinal em 7,52 ppm corresponde aos hidrogênios equivalentes, H10 e H12, onde poder-se-ia esperar que sua multiplicidade correspondesse a um triplo duplete, porém o que se observa é apenas um triplo, podendo ser consequência destes hidrogênios acoplarem com uma constante *meta* pequena, somada a baixa resolução do equipamento, estes hidrogênios (H10 e H12) também acoplam em *orto*, com seus respectivos hidrogênios vicinais, com $J = 7,3$ Hz. O sinal em 7,65 ppm refere-se ao H11, embora não tenha desdobrado claramente seus sinais, trata-se de um triplo triplo, que acopla em *orto* com $J = 7,3$ e *meta* com $J = 1,5$. O sinal em 8,22 ppm referem-se aos hidrogênios equivalentes H9 e H13, que acoplam em *orto* com $J = 7,1$ Hz, com os hidrogênios H10 e H12, em *meta* com $J = 1,5$ Hz com o hidrogênio H11.

O espectro de RMN ^{13}C para o composto **3c**, possui 4 sinais a mais do que o composto **3a** na região de carbonos aromáticos, correspondente aos seis carbonos do grupo benzila, sendo o sinal em 128,6 ppm correspondente aos carbonos equivalentes C10 e C12, o sinal em 129,7 ppm referente ao carbono quaternário C8, o sinal em 130,1 ppm os carbonos equivalentes C9 e C13 e o sinal em 133,5 ppm refere-se ao C11. Outra diferença também pode ser observada na região de C sp^3 com a ausência do sinal do carbono do grupo metila da porção éster (C8, Figura 16, p. 49) do composto **3a**.

Figura 25. Espectros de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3) para o a) composto **3a** com expansão da região entre 20 e 28 ppm e b) composto **3c**.



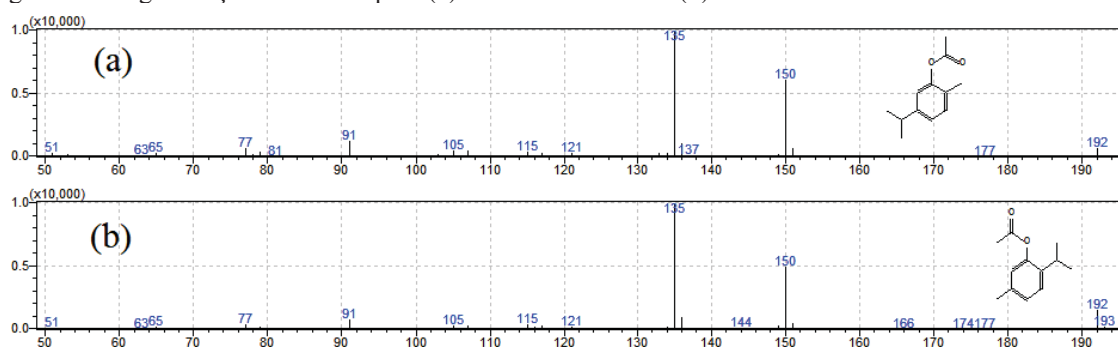
Desta forma, pode-se afirmar que o produto gerado da reação de obtenção de **3c**, corresponde ao benzoato de timoila.

Os demais compostos benzoilados, foram também submetidos aos mesmos processos de análise e podem ser caracterizados de forma semelhante ao que foi apresentado para **3c**.

4.4 Diferenças espectrais entre os derivados acilados de timol e carvacrol

Timol e carvacrol são isômeros constitucionais, diferem apenas na posição em que o grupo hidroxila está ligado ao anel aromático, como pode ser observado na Figura 10 (p. 45). Por tanto, não é possível diferenciar uma estrutura da outra, em nenhuma das suas derivatizações observando seus espectros de massas, pois apresenta essencialmente o mesmo padrão de fragmentação, exemplificado na Figura 26, em que se comparam as fragmentações de massas encontradas na biblioteca do equipamento para os seus acetatos correspondentes.

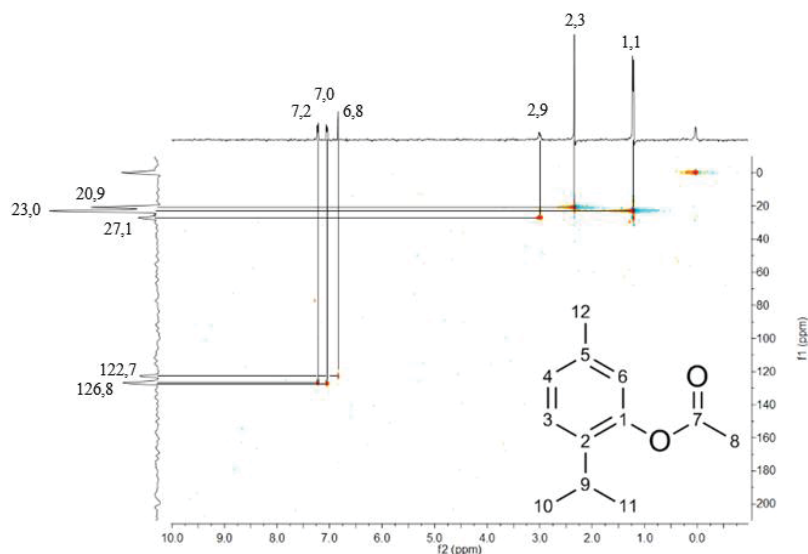
Figura 26. Fragmentação de massas para (a) acetato de timoila e (b) acetato de carvacrila.



FONTE: GCMS solution, Lybrary.

Os espectros de RMN ^1H para os compostos acilados de timol e carvacrol, não mostram diferenças conclusivas, que permitam diferenciá-los. Desta maneira, para diferenciar as estruturas foi necessário realizar os experimentos de RMN 2D, os mapas de correlação de HSQC (correlação direta ^1H - ^{13}C) e HMBC (correlação a longa distância ^1H - ^{13}C).

O mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C exposto na Figura 27, permitiu associar os hidrogênios e carbonos que estão diretamente ligados.

Figura 27. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (CDCl_3) para **3a**.

De acordo com o espectro de RMN ^{13}C para **3a** (Figura 16, p. 49), sabe-se que os carbonos C8 e C12 apresentam seus sinais com deslocamento muito próximo (20,8 e 21,0 ppm, respectivamente), assim como os carbonos C4 e C3 (127,2 e 126,5 ppm respectivamente), portanto, os sinais com deslocamento 20,9 e 126,8 ppm no mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C , correspondem aos carbonos C8, C12 e C4, C3 respectivamente.

A atribuição dos carbonos e hidrogênios ficam da seguinte forma:

Tabela 3. Atribuições de carbonos e hidrogênios ligados diretamente e a longa distância, para **3a**.

Posição	δ_{H}	δ_{C}	$\text{LDJ}_{\text{H,C}}$
1	-	147,9	-
2	-	136,5	-
3	7,2	126,8	147,9-136,5-126,8-27,1
4	7,0	126,8	126,8-137,0-127,7-20,9
5	-	137,0	-
6	6,8	127,7	147,9-126,8-137,0-20,9
7	-	169,8	-
8	2,3	20,9	169,8
9	2,9	27,1	147,9-136,5-126,8-23,0
10	1,1	23,0	136,5-27,1
11	1,1	23,0	136,5-27,1
12	2,3	20,9	126,8-137,0-127,7

Figura 28. Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C (CDCl_3) para **4a**.

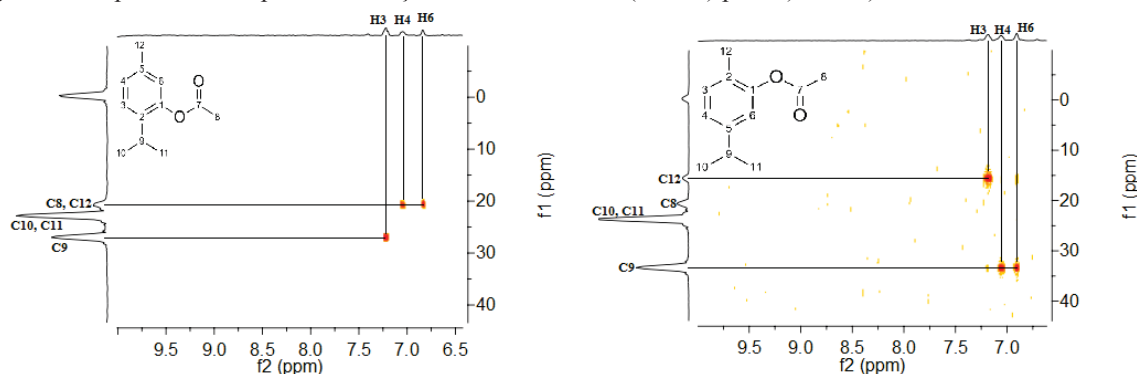
A partir do mapa de Correlação direta ^1H - ^{13}C para **4a** (Figura 28), pode-se atribuir os carbonos e hidrogênio da seguinte forma:

Tabela 4. Atribuições de carbonos e hidrogênios ligados diretamente e a longa distância, para **4a**.

Posição	δ_{H}	δ_{C}	$^{\text{LD}}\text{J}_{\text{H,C}}$
1	-	149,2	-
2	-	127,1	-
3	7,1	130,8	148,0-15,7
4	7,0	124,1	127,1-119,7-33,5
5	-	148,0	-
6	6,8	119,7	149,2-127,1-124,1-33,5
7	-	169,3	-
8	2,3	20,8	169,3
9	2,8	33,5	124,1-148,0-119,7-23,8
10	1,2	23,8	148,0-33,5
11	1,2	23,8	148,0-33,5
12	2,1	15,7	149,2-127,1-130,8

As diferenças espectrais capazes de distinguir os derivados de timol e carvacrol, são notadas observando no mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C .

Figura 29. Expansão do mapa de correlação de RMN HMBC (CDCl_3) para a) **3a** e b) **4a**.



O mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C da Figura 29, para **3a**, mostra que H4 e H6, possui correlação a distância de 3 ligações (J3), com C12. Enquanto que o composto **4a**, apenas um hidrogênio (H3) apresenta correlação com C12. Da mesma forma que, para **3a** apenas um hidrogênio (H3) correlaciona-se com C9 a J3, enquanto que, **4a** apresenta os H4 e H6 da região de aromáticos correlacionam-se, a J3, com C9. As diferenças espectrais discutidas, comprovam a posição em que o grupo acetato está ligado ao anel aromático, corroborando com a afirmação de que os produtos formados da reação de obtenção de **3a** e **4a** realmente são acetato de timoíla e acetato de carvacríla.

As demais correlações a longa distância ^1H - ^{13}C estão expressas na Tabela 5.

Tabela 5. Correlações a longa distância ^1H - ^{13}C para **3a** e **4a**.

Composto 3a		Composto 4a	
H	$^{LD}J_{H,C}$	H	$^{LD}J_{H,C}$
H3	C1, C2, C4, C9	H3	C5, C12
H4	C3, C5, C6, C12	H4	C2, C6, C9
H6	C1, C4, C5, C12	H6	C1, C2, C4, C9
H8	C7	H8	C7
H9	C1, C2, C3, C10, C11	H9	C5, C4, C6, C10, C11
H10, H11	C9, C2	H10, H11	C5, C9
H12	C4, C5, C6	H12	C1, C2, C3

4.5 Teste do crescimento micelial

A maior parte dos fungos fitopatogênicos possuem talo micelial, que desempenham importantes funções no desenvolvimento do fungo. Este tipo de estrutura é composta por filamentos tubulares (hifas) e é através destas estruturas que o fungo coloniza o seu substrato e absorve água e nutrientes (AMORIM, REZENDE E BERGAMIN FILHO 2011).

A média dos resultados obtidos para o teste de crescimento micelial realizado com os compostos precursores e seus derivados frente aos fungos *C. nymphaeae* e *C. fructicola* estão expressos na Tabela 6, para facilitar a comparação estrutura/atividade, no **ANEXO 1**

encontram-se todas as estruturas estudadas e suas respectivas numerações. O fungicida utilizado como controle, foi o tiofanato metílico a concentração de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que apresentou frente a *C. nymphaeae* um controle de $-7,3 \% \pm 9,2$ e contra *C. fructicola* $100 \% \pm 0,0$ de inibição do crescimento micelial.

Tabela 6. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de *C. nymphaeae* e *C. fructicola* nas diferentes concentrações de derivados de óleos essenciais.

Tratamentos/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	% de inibição		Tratamentos/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	% de inibição	
	<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. fructicola</i>		<i>C. nymphaeae</i>	<i>C. fructicola</i>
1/1000	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	3/600	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
1/600	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	3/200	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
1/300	87,9 \pm 5,2	80,8 \pm 7,3	3/125	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
1/200	73,0 \pm 11,0	77,8 \pm 4,0	3/50	84,4 \pm 1,4	80,1 \pm 0,8
1/80	57,6 \pm 9,7	45,6 \pm 3,3	3/20	67,0 \pm 15,7	57,1 \pm 17,7
1a/1000	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	3a/1000	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
1a /600	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	3a/600	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
1a /300	85,2 \pm 6,6	84,1 \pm 4,9	3a/200	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
1a /200	72,4 \pm 4,2	62,5 \pm 3,5	3a/125	91,3 \pm 4,2	88,6 \pm 5,6
1a /100	34,6 \pm 1,1	41,2 \pm 2,1	3a/50	45,9 \pm 3,8	43,6 \pm 8,5
1b/1000	76,4 \pm 1,1	70,4 \pm 2,6	3b/600	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
1b/800	72,5 \pm 2,8	56,0 \pm 6,2	3b/200	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
1b/600	70,7 \pm 2,2	64,4 \pm 3,2	3b/125	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
1b/200	54,0 \pm 3,8	53,7 \pm 2,6	3b/50	62,3 \pm 5,4	45,8 \pm 16,8
1c/1200	44,5 \pm 1,1	45,6 \pm 2,8	3c/1200	57,7 \pm 3,8	41,2 \pm 3,8
1c/1000	50,0 \pm 2,9	57,4 \pm 3,0	3c/1000	73,4 \pm 1,5	66,3 \pm 2,5
1c/600	33,9 \pm 7,4	51,9 \pm 5,5	3c/600	72,6 \pm 3,4	63,6 \pm 2,5
1c/200	28,7 \pm 6,2	31,0 \pm 3,2	3c/200	52,5 \pm 5,1	43,8 \pm 3,9
2/1200	100,0 \pm 0,0	92,9 \pm 9,4	4/200	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
2/1000	88,5 \pm 13,3	82,4 \pm 4,4	4/125	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
2/800	90,1 \pm 19,8	68,1 \pm 27,8	4/75	88,5 \pm 11,0	90,7 \pm 11,1
2/600	93,1 \pm 13,8	86,1 \pm 9,6	4/50	70,6 \pm 3,2	69,1 \pm 2,9
2/200	32,8 \pm 2,9	38,4 \pm 3,8	4/25	1,1 \pm 15,0	3,3 \pm 17,9
2a/1200	97,3 \pm 5,5	84,6 \pm 2,5	4a/1000	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
2a/1000	90,8 \pm 6,5	86,6 \pm 1,8	4a/600	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
2a/800	95,6 \pm 8,8	86,8 \pm 7,2	4a/200	93,5 \pm 7,8	89,4 \pm 8,3
2a/600	84,5 \pm 12,4	95,8 \pm 8,3	4a/125	79,7 \pm 11,3	76,3 \pm 11,0
2a/200	39,7 \pm 8,9	60,6 \pm 3,2	4a/50	42,4 \pm 11,1	35,2 \pm 5,1
2b/1400	56,6 \pm 10,5	64,3 \pm 4,9	4b/1000	97,7 \pm 1,5	97,3 \pm 0,0
2b/1200	65,9 \pm 4,2	54,9 \pm 9,6	4b /600	100,0 \pm 0,0	93,9 \pm 2,6
2b/1000	56,9 \pm 6,6	66,2 \pm 5,5	4b /200	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0
2b/600	52,3 \pm 4,7	62,5 \pm 7,0	4b /125	87,9 \pm 2,0	80,5 \pm 1,7
2b/200	36,8 \pm 6,1	37,5 \pm 2,3	4b /50	57,1 \pm 1,7	49,6 \pm 0,8
2c/1000	39,1 \pm 9,5	48,1 \pm 3,7	4c/1000	48,6 \pm 5,3	62,3 \pm 2,5
2c/600	21,3 \pm 6,0	36,6 \pm 4,1	4c/600	36,7 \pm 5,5	46,5 \pm 1,3
2c /200	17,2 \pm 7,7	25,0 \pm 1,9	4c/200	29,7 \pm 6,0	30,6 \pm 3,9

A capacidade de inibição do crescimento micelial do eugenol (**1**) e seus derivados mostram um padrão bem definido, em que pode-se observar claramente que, aumentando o tamanho da cadeia carbônica do éster na estrutura dos grupos substituintes (**1a**, **1b** e **1c**), diminui a eficácia do mesmo. Comparando-se a inibição apresentada por eugenol (**1**) e acetato de eugenila (**1a**) percebe-se que possuem atividades semelhantes (em torno de 84% de inibição na concentração de 300 mg·L⁻¹), mostrando que esta modificação entrutural para esta fase do desenvolvimento do fungo não modifica sua atividade.

Percebe-se que a mesma tendência discutida no paragrafo anterior é expressa por isoeugenol e seus derivados (**2**, **2a**, **2b** e **2c**). Também é interessante notar que a ligação dupla conjugada ao anel aromático na estrutura do isoeugenol (**2**), atenua a sua atividade frente aos fungos testados.

Resultado expostos por Dev et al. (2004), encontram cenário semelhante ao desta pesquisa para eugenol e isoeugenol. Nos quais, os pesquisadores testaram a atividade antifúngica de eugenol e isoeugenol contra *Colletotrichum graminicola* e *Fusarium solani*. Com a pesquisa, encontraram que eugenol na concentração de 270 ppm e 340 ppm, inibiu totalmente o crescimento micelial de *C. graminicola* e *F. solani*, respectivamente. No entanto, apenas as concentrações de 4760 ppm e 4920 ppm de isoeugenol inibiu o crescimento micelial de *C. graminicola* e *F. solani*, respectivamente.

Xie, et al. (2017), testaram a atividade antifúngica de alguns derivados de eugenol e isoeugenol frente a dois fungos patogênicos de plantas, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*. Com os resultados obtidos os pesquisadores puderam estabelecer uma classificação em termos de IC₅₀. Contra *R. solani* obteve-se: metiliseugenol (29,2 mg·L⁻¹) > **isoeugenol (33,1 mg·L⁻¹)** > metileugenol (34,0 mg·L⁻¹) > **acetato de isoeugenila (38,6 mg·L⁻¹)** > **eugenol (58,9 mg·L⁻¹)** > **acetato de eugenila (75,3 mg·L⁻¹)**. Por outro lado, a ordem de IC₅₀ para *F. oxysporum* foi: **eugenol (55,9 mg·L⁻¹)** > metiliseugenol (79,5 mg·L⁻¹) > **acetato de isoeugenila (82,2 mg·L⁻¹)** > **isoeugenol (97,2 mg·L⁻¹)** > **acetato de eugenila (109,7 mg·L⁻¹)** > metileugenol (175,2 mg·L⁻¹). Assim, nota-se que a fungitoxidade de eugenol, isoeugenol e seus derivados variam de acordo com o fungo avaliado.

Os resultados apresentados para timol (**3**), carvacrol (**4**) e seus derivados não seguem a mesma tendência apresentada por eugenol, isoeugenol e seus derivados (**1**, **1a**, **1b**, **1c**, **2**, **2a**, **2b** e **2c**). Butirato de timoíla (**3b**) apresenta atividade ligeiramente inferior a do timol (**3**). Acetato de timoíla (**3a**) apresenta total inibição do crescimento micelial na concentração de 200 mg·L⁻¹.

As modificações estruturais realizadas na molécula do carvacrol (**4**) diminuíram a sua

atividade, embora as atividades tenham expressado a mesma tendência que a observada para os derivados do timol (**3a**, **3b**, **3c**). De maneira geral carvacrol e seus derivados (**4**, **4a**, **4b** e **4c**) manifestaram menor atividade contra os fungos testados.

Os resultados oriundos dos testes realizados por esta pesquisa estão em boa sintonia com os dados expressos na literatura. Numpaque et al. (2011), determinaram que timol e carvacrol inibem 100% do crescimento micelial de *C. acutatum* durante 4 dias, nas concentrações de 100 mg·L⁻¹ e 125 mg·L⁻¹, respectivamente. Nas mesmas condições timol e carvacrol inibem 100% o crescimento micelial de *Botryodiplodia theobromae*, com as concentrações de 100 mg·L⁻¹ e 150 mg·L⁻¹, respectivamente. O mesmo efeito foi observado por Tsao e Zhou (2000), na concentração de 100 mg·L⁻¹ timol e carvacrol foram capazes de inibir 100% do crescimento micelial dos fungos *Botrytis cinerea* e *Monilinia fructicola*, adicionalmente, encontraram para eugenol na mesma concentração, inibição de 85% e 90%, para *M. fructicola* e *B. cinerea*, respectivamente.

4.6 Concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima, se deu, através da observação da atividade dos compostos de ocorrência natural e sintetizados frente aos conídios de *C. nymphaeae* e *C. fructicola*. Os conídios são a estrutura básica de reprodução dos fungos, atuam como elemento de dispersão dos fungos, capazes de gerar um novo indivíduo adulto, sem necessidade de fundir-se com outra célula. Os conídios podem também se especializar para a sobrevivência do fungo (BERGAMIN FILHO, KIMATI e AMORIM, 1995). Desta forma os conídios são alvos importantes, em se tratando de metodologias de combate a doenças de plantas.

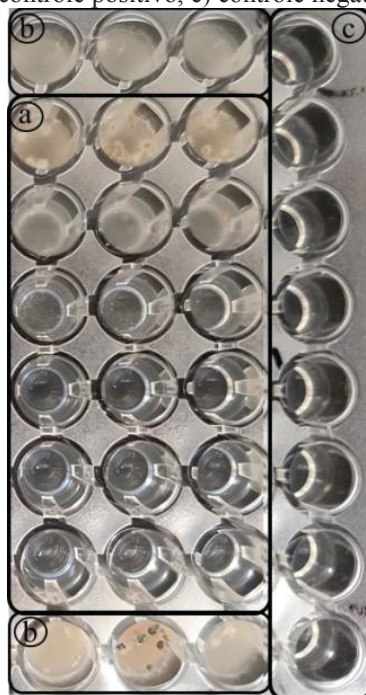
Para determinação da CIM foi necessário observar a densidade ótica (DO) gerada por cada poço de uma placa de microdiluição, dentro de um gradiente de concentrações dos compostos na qual estão inseridos os conídios dos fungos pesquisados, comparando-os com os poços dos controles positivos e negativos.

Tabela 7. Densidades óticas obtidas para teste com acetato de carvacrila (**4a**) frente ao fungo *C. nymphaeae*.

	Dia 1		Dia 7	
	DO _{405nm}		DO _{405nm}	
Controle positivo	0,319	± 0,010	1,706	± 0,088
Controle negativo	0,205	± 0,009	0,205	± 0,019
Tratamento 50 mg·L ⁻¹	0,316	± 0,003	1,530	± 0,125
Tratamento 100 mg·L ⁻¹	0,268	± 0,007	1,091	± 0,028
Tratamento 150 mg·L ⁻¹	0,281	± 0,003	0,592	± 0,034
Tratamento 200 mg·L ⁻¹	0,281	± 0,007	0,261	± 0,005
Tratamento 250 mg·L ⁻¹	0,291	± 0,004	0,264	± 0,004
Tratamento 300 mg·L ⁻¹	0,283	± 0,004	0,260	± 0,007
CIM	200	mg·L ⁻¹		

Observando a densidade ótica (Tabela 7) apresentada pelo gradiente de concentração para acetato de carvacrila (**4a**), pode-se observar que nas três maiores concentrações (300, 250 e 200 mg·L⁻¹) a densidade ótica se assemelha ao controle negativo, indicando não ter ocorrido atividade dos fungos inoculados, nestas concentrações dos tratamentos. Por sua vez, nas três concentrações menores (150, 100 e 50 mg·L⁻¹), a densidade ótica é diferente do controle negativo e passa a alcançar valores mais próximos ao controle positivo, indicando que houve atividade dos fungos inoculados. Assim, a mínima concentração de acetato de carvacrila (**4a**) que foi capaz de inibir totalmente a atividade de *C. nymphaeae*, foi 200 mg·L⁻¹. O mesmo resultado foi alcançado no segundo teste. Visualmente também pode-se identificar os poços nos quais houve atividade biológica, como visto na Figura 30. Em que, ao observar as três últimas linhas de poços (200, 250 e 300 mg·L⁻¹) dentro do gradiente de concentrações (Figura 30a), percebe-se que possuem a mesma translucidez que o controle negativo (Figura 30c), indicando não haver atividade biológica. Também, ao observar as três primeiras linhas de poços (50, 100 e 150 mg·L⁻¹) dentro do gradiente de concentrações (Figura 30a), percebe-se que possuem maior turbidez, a primeira linha de poços (50 mg·L⁻¹) se assemelha ao controle positivo (Figura 30b), indicando atividade biológica.

Figura 30. Placa de Microdiluição no sétimo dia de teste frente a *C. nymphaeae*, em que, a) acetato de carvacrila (**4a**) em gradiente de concentração, b) controle positivo, c) controle negativo.



Ao observar a densidade ótica apresentada pelo gradiente de concentração de acetato de eugenila (**1a**), na Tabela 8, percebe-se um grande aumento na média da densidade ótica obtida para todas as concentrações do gradiente, se comparados com os resultados obtidos no primeiro dia com o sétimo dia transcorridos após a montagem do teste.

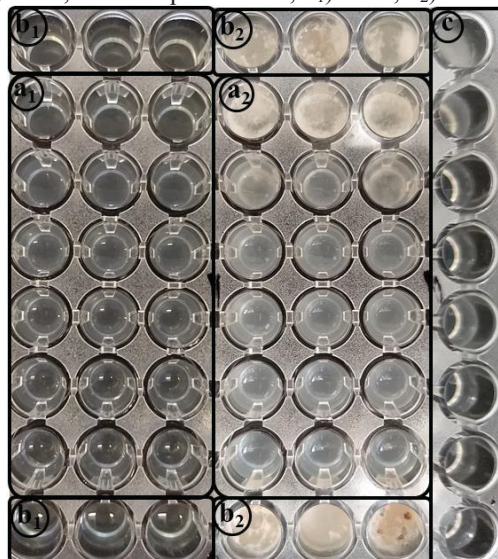
Tabela 8. Densidades óticas obtidas para teste com acetato de eugenila (**1a**) frente ao fungo *C. nymphaeae*.

	Dia 1		Dia 7	
	DO _{405nm}		DO _{405nm}	
Controle positivo	0,309	± 0,011	1,705	± 0,236
Controle negativo	0,210	± 0,006	0,225	± 0,024
Tratamento 50 mg·L ⁻¹	0,404	± 0,003	1,708	± 0,191
Tratamento 175 mg·L ⁻¹	0,501	± 0,005	1,231	± 0,080
Tratamento 300 mg·L ⁻¹	0,538	± 0,008	0,997	± 0,008
Tratamento 425 mg·L ⁻¹	0,470	± 0,004	1,070	± 0,040
Tratamento 550 mg·L ⁻¹	0,380	± 0,015	0,937	± 0,056
Tratamento 675 mg·L ⁻¹	0,316	± 0,002	0,734	± 0,016
CIM	>675 mg·L ⁻¹			

Desta maneira, mesmo a maior concentração testada (675 mg·L⁻¹) não inibiu a atividade de *C. nymphaeae*. O mesmo resultado foi obtido para acetato de eugenila (**1a**) no segundo teste. Observando a Figura 31 pode-se perceber um aumento na turbidez nos poços do tratamento (Figura 31a₁ e Figura 31a₂), indicando que houve algum tipo de atividade, que ocasionou este aumento, concordando com o resultado alcançado através da observação das densidades óticas

dos respectivos poços do tratamento.

Figura 31. Teste em placa de Microdiluição, com acetato de eugenila (**1a**) frente a *C. nymphaeae*, em que, gradiente de concentração no, a₁) dia 1, a₂) dia 7, controle positivo no, b₁) dia 1, b₂) dia 7 e c) controle negativo dia 7.



Seguindo a mesma lógica, foi possível determinar a concentração inibitória mínima para todos os compostos frente as duas espécies de fungos, nas quais os resultados estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9. CIM obtido para os tratamentos frente a *C. nymphaeae* e *C. fructicola*.

Tratamento	<i>C. nymphaeae</i>		<i>C. fructicola</i>	
	CIM A (mg·L ⁻¹)	CIM B (mg·L ⁻¹)	CIM A (mg·L ⁻¹)	CIM B (mg·L ⁻¹)
1	> 675	>675	> 675	> 675
1a	> 675	>675	> 676	> 676
1b	>1400	>1400	> 1400	1000
1c	1000	1000	1000	1000
2	<400	600	600	<400
2a	1200	1200	1200	1200
2b	600	>1400	>1400	800
2c	1000	1000	>1400	>1400
3	100	100	100	100
3a	200	200	200	200
3b	100	100	100	100
3c	1000	1000	1000	1000
4	100	100	100	100
4a	200	200	200	200
4b	200	200	200	200
4c	1000	1000	>1400	1000
Mancozebe	50	50	>50	50

A atividade inibitória frente aos conídios de ambos os fungos apresentado por timol,

carvacrol e seus derivados (**3**, **3a**, **3b**, **3c**, **4**, **4a**, **4b** e **4c**), mantém a mesma tendência que o observado na fase de crescimento micelial. As derivatização dos compostos fenólicos para os ésteres de cadeia curta (acetato e butirato) não provocam perda acentuada em sua atividade. O butirato de timoila (**3b**) possui o mesmo CIM que timol e carvacrol (**3** e **4**) contra ambos os fitopatógenos ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), os derivados butirato de carvacrila, acetato de carvacrila e de timoila (**4b**, **4a** e **3a**, respectivamente), foram um pouco menos efetivos ($200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). No entanto, a modificação da hidroxila fenólica para éster benzoato, provoca uma perda muito grande nas atividades dos derivados de carvacrila e de timoila (**4c** e **3c**), apresentando CIM apenas com a concentração de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Eugenol e acetato de eugenila (**1** e **1a**) mostraram ser mais ativos em uma fase específica do desenvolvimento fúngico. Na concentração de $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ambos os compostos inibiram totalmente o crescimento micelial. Na fase de germinação dos conídios, mesmo com a maior concentração testada ($675 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), não foi observada inibição do desenvolvimento dos fungos testados.

Através da conversão da CIM ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para CIM ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), a Tabela 10 dá uma ideia da quantidade de matéria necessária para causar inibição total dos fitopatógenos.

Tabela 10. Conversão da CIM ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para CIM ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Composto	$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	CIM ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	CIM ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
Mancozebe	541,01 g/mol	50	0,0924
3	150.221 g/mol	100	0,666
3a	192.258 g/mol	200	1,040
3b	220.312 g/mol	100	0,454
4	150.221 g/mol	100	0,666
4a	192.258 g/mol	200	1,040
4b	220.312 g/mol	200	0,908

Isoeugenol (**2**), no teste de concentração inibitória mínima, mostrou resultados divergentes entre os testes independentes A e B, porém apresentou o mesmo comportamento tanto para *C. nymphaeae* quanto para *C. fructicola* (Tabela 9), em que, para ambos a menor concentração testada ($400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) inibiu totalmente a atividade dos fungos. Os demais derivados de eugenol e isoeugenol (**1b**, **1c**, **2a**, **2b** e **2c**) foram muito menos ativos contra os fungos testados.

Alzate et al. (2009), encontraram resultado semelhante, avaliando a atividade de timol contra *Colletotrichum acutatum*. A concentração de $125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, foi capaz de inibir totalmente a germinação dos conídios. Em uma pesquisa realizada por Herath e Abeywickrama (2008), eugenol se mostrou pouco ativo contra *Colletotricum musae*, a concentração de eugenol

necessária para inibir totalmente a germinação dos conídios de *C. musae* foi de 0,14% (1400 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$), contra *Fusarium proliferatum*, foi de 0,12% (1200 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$).

Abbaszadeh et al. (2014), testou timol, carvacrol e eugenol, frente a vários fungos que causam prejuízos em alimentos e que também são fitopatogênicos. De maneira geral, carvacrol apresentou atividade igual ou superior ao timol contra os fungos testados, enquanto que, eugenol em todos os casos teve CIM maior que ambos. Desta forma, foi mostrando que, assim como para na fase de crescimento micelial, a extensão da atividade destes compostos depende dos fungos testados. Os resultados encontrados pelos pesquisadores estão resumidos na Tabela 11.

Tabela 11. Valores de CIM encontradas por Abbaszadeh et al. contra vários fungos.

Fungos	CIM ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	Timol	Carvacrol	Eugenol
<i>Aspergillus ochraceus</i>	125	100	350
<i>Alternaria alternata</i>	400	350	500
<i>Botrytis cinerea</i>	300	300	450
<i>Cladosporium spp.</i>	100	100	350
<i>Penicillium citrinum</i>	250	150	350
<i>Fusarium oxysporum</i>	300	125	400
<i>Rhizopus oryzae</i>	450	200	350

Fonte: adaptado de Abbaszadeh et al. (2014);

Como verificado nos resultados expostos, timol (3), carvacrol (4), eugenol (1) e isoeugenol (2), apresentaram atividade igual ou superior aos seus derivados ésteres, indicando que há alguma particularidade em suas estruturas, que as proporcionam sua atividade antimicrobiana. Muitos pesquisadores têm atribuído a forte atividade antibacteriana e antifúngica, dos compostos naturais como, timol carvacrol e eugenol, à presença da hidroxila fenólica (DORMAN e DEANS, 2000; FAID, CHARAI e MOSADDAK, 1996; NUMPAQUE et al., 2011; ULTEE et al., 2002 e VELDHUIZEN et al., 2006). Segundo Faid, Charai e Mosaddak (1996), a atividade antimicrobiana de óleos essenciais possui uma correlação positiva com a quantidade de substâncias fenólicas neles presentes. Óleos essenciais com grande conteúdo de compostos fenólicos, apresentam maior atividade antifúngica do que outras funções orgânicas, como, álcoois não aromáticos, aldeídos e hidrocarbonetos. Ultee et al. (2002), atribui o modo de ação destes compostos à hidroxila fenólica, a qual atua como um trocador de prótons, reduzindo assim o gradiente de pH através da membrana citoplasmática. Veldhuizen et al. (2006), testam compostos com estrutura análoga ao do carvacrol e descobrem que a retirada da hidroxila fenólica da estrutura do carvacrol, promove grande perda em sua

atividade bactericida. Também demonstraram que substituir a hidroxila fenólica por um grupo amina não provoca grande prejuízo à atividade do carvacrol. Numpaque et al. (2011), expõem *C. acutatum* e *B. theobromae* aos compostos timol e carvacrol, com o intuito de avaliar a biotransformação gerada pelos fungos na estrutura química de ambos os compostos. A hidroxilação aromática e alifática, somado a metilação e acetilação do grupo hidroxila no anel aromático, representam as principais vias metabólicas de timol e carvacrol por ambos os fungos fitopatogênicos. As transformações geradas nestes pontos específicos, podem ser o resultado de um processo de desintoxicação de ambos os compostos fenólicos por *C. acutatum* e *B. theobromae*.

No entanto, por vezes, há pesquisas demonstrando que a derivatização da hidroxila fenólica para grupos ésteres e éteres pode aumentar a atividade de compostos como os estudados nesta pesquisa, atribuindo a hidroxila fenólica um papel menos importante. Mathela, Singh e Gupta (2010), puderam perceber que, as derivatizações da hidroxila fenólica de timol para acetato, propionato e isobutirato de timoila, melhoraram a sua atividade bactericida. Xie et al. (2017), encontraram metiliseugenol, imprimindo maior atividade fungicida que isoeugenol e metileugenol mais ativo que eugenol frente a *R. solani*. Frente a *F. oxysporum*, metiliseugenol, acetato de isoeugenila foram mais ativos que isoeugenol.

As relações estrutura atividade apresentada pelos compostos estudados nesta pesquisa, encontram semelhanças com as conclusões apresentadas por Carrasco et al. (2012), em que, utilizaram vinte e um fenilpropanoides naturais e sintéticos, com estruturas análogas ao do eugenol (incluindo safrol e isoeugenol), para avaliar suas propriedades antifúngicas, contra uma variedade de fungos patogênicos oportunistas humanos. Ao comparar compostos com estruturas semelhantes, identifica-se que a presença do grupo alila (presente em eugenol (1), ausente em isoeugenol (2), Figura 10, p. 45) é muito importante para a característica antifúngica destes fenilpropanoides análogos ao eugenol. A mesma pesquisa chegou à conclusão que a hidroxila fenólica não teve nenhuma influência sobre a atividade antifúngica dos análogos do eugenol, uma vez que a hidroxila estando esterificada na forma de acetato, não resultou em prejuízo para a atividade final dos compostos comparados.

Outra discussão divergente levantada entre pesquisas, está ligada com a relação existente entre hidrofiliabilidade e hidrofobicidade e a atividade biológica que as substâncias possuem. Sikkema et al. (1995); Gill e Holley (2006), descobriram que o mecanismo antibacteriano de ação do eugenol, poderia ser devido ao fato da hidroxila fenólica aumentar a solubilidade desta molécula em suspensões aquosas, melhorando a capacidade de passar através da parte hidrofílica do envelope da célula. Esta afirmação entra em contradição com um estudo

de relações quantitativas estrutura-atividade de componentes de óleos essenciais realizado por Voda, Boh e Vrtačnik (2004). No referido estudo descobriu-se que as melhores atividades antifúngicas eram exibidas pelos fenilpropanoides mais hidrofóbicos que possuem uma maior capacidade de penetrar nas paredes das células fúngicas do que as hidrofílicas.

Consultando ao PubChem, que é um banco de dados de moléculas operado e mantido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI), pôde-se criar a Tabela 12, contendo informações físico-químicas dos compostos pesquisados e o PubChem CID de cada composto, para consulta nesta base de dados. Para os compostos ésteres derivados, utilizou-se os valores de XLOGP3, que se trata de um método de adição de átomos para o cálculo do coeficiente de partição octanol/água (log P), fornecendo o valor de log P para um composto dado pela soma das contribuições de átomos componentes e fatores de correção (CHENG et al., 2007).

Tabela 12. Valores de log P e pKa dos compostos, **1** à **4c**.

Compostos	PubChem		PubChem CID	Compostos	PubChem		PubChem CID
	Log P/pKa ¹	XlogP3			Log P/pKa ¹	XlogP3	
1	2,49/10,19	2	3314	3	3,3/10,62	3,3	6989
1a	<i>i</i>	2,3	7136	3a	<i>i</i>	3	68252
1b	<i>i</i>	3,1	16205183	3b	<i>i</i>	3,8	228740
1c	<i>i</i>	4,4	62362	3c	<i>i</i>	4,7	11345820
2	3,04/9,88	2,6	853433	4	3,49/10,38 ²	3,1	10364
2a	<i>i</i>	2,4	876160	4a	<i>i</i>	3	80792
2b	<i>i</i>	3,5	16205511	4b	<i>i</i>	<i>i</i>	<i>i</i>
2c	<i>i</i>	4,3	6437317	4c	<i>i</i>	4,8	836527

i = inexistente nesta base de dados; ¹ = pKa à 25°C; ²:

<<https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound/inspect/CHEMBL281202>>;

Ao considerar os pKa's dos compostos **1**, **2**, **3** e **4**, pode-se dizer que quanto menor o pKa menor é a atividade que a substância apresenta frente aos fungos testados. Esta observação vai de encontro ao proposto por Ultee et al. (2002), em que a hidroxila atua como um trocador de prótons, desta maneira, para eles quanto menor o pKa de uma substância maior seria a sua capacidade de trocar prótons com o meio, aumentando sua atividade antimicrobiana.

Comparando-se os valores de log P calculados (Tabela 12), com as atividades biológicas apresentadas pelos derivados de um mesmo composto (ex. **1**, **1a**, **1b** e **1c**), percebe-se que em alguns casos há uma relação entre os dados. Partindo do composto **1** (XlogP3 = 2), nota-se que quanto maior o XlogP3 menor é a atividade biológica apresentada pelos compostos. Com os derivados de **2**, ocorre algo semelhante, os dois compostos de menor XlogP3 possuem as

melhores atividades biológicas, à medida que o XlogP3 aumenta, diminui a atividade biológica apresentada por eles. Para os derivados de **3** e **4**, não há uma boa relação entre as informações, neste caso parece haver um limiar para o log P, em que, se ultrapassado este limiar, os compostos derivados passam a perder as propriedades biológicas frente aos fungos estudados. Porém, ao comparar os dados entre os derivados de diferentes compostos, não há como estabelecer uma relação coerente entre eles. Por exemplo, comparando os compostos com XlogP3 semelhantes, **1a** = 2,3 e **2a** = 2,4, nota-se que a atividade biológica entre eles é consideravelmente desigual, o mesmo acontece entre os compostos **1b**, **3a**, **4** e **4a**.

De maneira geral, a atividade biológica dos compostos estudados, não apresentam uma relação muito clara com as suas características físico-químicas (pKa e log P). Para se obter um melhor entendimento de como essas características alteram a atividade biológica de tais substâncias, seria necessário conduzir novos testes biológicos, com estruturas análogas de um mesmo composto (composto **3**, por exemplo), as quais possuam substituintes capazes de alterar os seus respectivos pKa e log P.

Resumidamente, a Tabela 13 traz uma comparação, dos melhores resultados encontrados para os compostos estudados frente as duas fases do desenvolvimento de *C. fructicola* e *C. nymphaeae*.

Tabela 13. Melhores resultado encontrados para a fase de crescimento micelial e da CIM para *C. fructicola* e *C. nymphaeae*.

Compostos	Crescimento micelial (mg · L ⁻¹)	CIM (mg · L ⁻¹)
1	600	>675
1a	600	>675
2	>1200	<400, 600
3	125	100
3a	200	200
3b	125	100
4	125	100
4a	200	600
4b	200	200

4.7 Teste *ex vivo*

Os compostos selecionados para a realização do teste *ex vivo* foram aqueles que apresentaram os melhores resultados de inibição do crescimento micelial. A mínima concentração na qual a substância foi capaz de inibir totalmente o crescimento micelial de ambos os fungos, foram as concentrações adotadas para cada composto testado. Os resultados obtidos para cada tratamento ao longo de 14 dias estão expostos na Tabela 14 e Tabela 15.

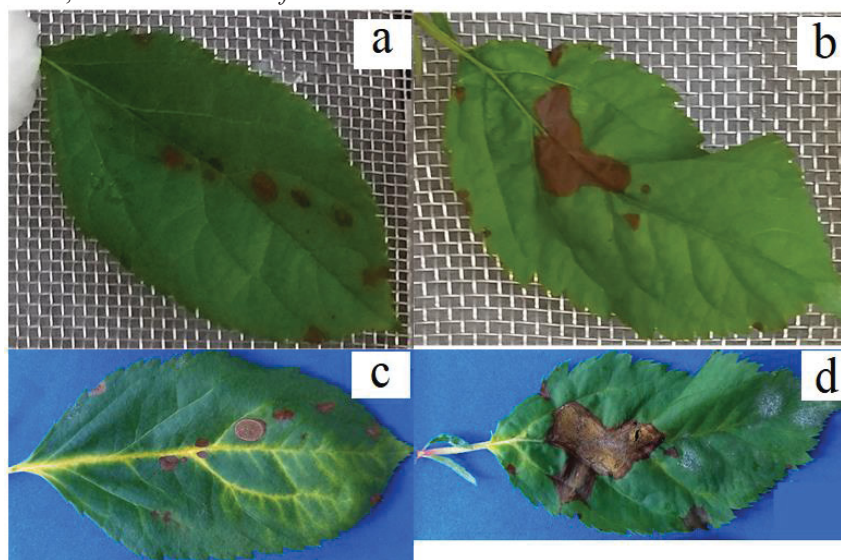
Tabela 14. Resultados do teste *ex vivo* em folhas de macieira inoculadas com *C. fructicola*.

Tratamento	mg/L	% controle dos sintomas de MFG						
		Dia 4*	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 14
Testemunha	-	90	55	30	30	10	10	5
Solvente	5000	80	60	30	25	5	0	0
Manzate-800	2000	100	100	95	95	90	90	85
3	125	75	55	25	25	20	20	15
3a	200	100	75	35	35	35	25	20
3b	125	75	60	35	25	20	20	15
4	125	80	50	30	25	20	15	15
4a	200	90	55	45	35	30	25	20
4b	200	85	65	25	20	20	15	10
1	600	80	70	60	50	40	40	40
1a	600	95	65	40	30	25	25	20

* Nos dias 1, 2 e 3, não há nenhum sintoma aparente (100% de controle).

No teste realizado com folhas inoculadas por *C. fructicola* (Tabela 14), observou-se uma queda mais acentuada no controle dos sintomas de MFG até o sexto dia de teste, a partir de então novos pontos com sintoma passam a aparecer mais lentamente. Para este fitopatógeno, todos os compostos mostraram possuir algum efeito protetor sobre as folhas de macieira, visto que todos os tratamentos obtiveram resultados de controle superiores ao da testemunha. Neste teste, obteve destaque o composto **1** (eugenol), o qual apresentou 40 % de controle da MFG até o 14º dia de avaliação do experimento, embora tenha causado fitotoxidez pontuais na superfície de algumas folhas, como mostrado na Figura 32.

Figura 32. Fitotoxidez causada por eugenol em, a) replicata 1 no dia 3, b) replicata 2 no dia 3, c) replicata 1 no dia 14, d) replicata 2 no dia 14, inoculadas com *C. fructicola*.



C. nymphaeae, foi mais patogênico que *C. fructicola*, já no terceiro dia de teste

começaram a aparecer sintomas e até o sexto dia de teste a maior parte dos tratamentos (9/11) não apresentavam controle algum a MFG (Tabela 15). O composto **1** também se destacou para este fitopatógeno, apresentando 15% de controle da doença no 8º dia de teste.

Tabela 15. Resultados teste *ex vivo* em folhas de macieira inoculadas com *C. nymphaeae*.

Tratamento	mg/L	% controle dos sintomas de MFG							
		Dia 3*	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 14
Testemunha	-	85	15	0	0	0	0	0	0
Solvente	5000	100	30	10	0	0	0	0	0
Manzate 800	2000	100	100	100	100	90	90	90	80
3	125	95	15	10	10	0	0	0	0
3a	200	100	35	10	0	0	0	0	0
3b	125	90	30	10	0	0	0	0	0
4	125	100	20	0	0	0	0	0	0
4a	200	90	40	20	0	0	0	0	0
4b	200	95	30	10	10	0	0	0	0
1	600	95	90	65	25	20	15	0	0
1a	600	95	75	5	0	0	0	0	0

* Nos dias 1 e 2, não há nenhum sintoma aparente (100% de controle).

No 8º dia de teste, todas as lesões causadas pela doença em cada uma das folhas foram avaliadas individualmente, com o intuito de avaliar se os tratamentos poderiam estar retardando o desenvolvimento dos fitopatógenos e consequentemente retardando o aparecimento dos sintomas mais severos.

Observando a distribuição percentual que cada tipo de sintoma representa em relação à totalidade (Tabela 16), pode-se perceber que alguns tratamentos foram capazes de atrasar o desenvolvimento da doença. Para o teste com *C. fructicola*, além de **1**, os compostos **3**, **3a**, **4a** e **4b**, mostraram serem capazes de prejudicar o desenvolvimento dos sintomas, notado pela maior distribuição percentual de sintomas menos severos (pontuações necróticas, clorose e sem sintoma), em relação a testemunha.

Tabela 16. Distribuição percentual dos sintomas de MFG de acordo com a sua severidade, para folhas inoculadas com *C. fructicola*.

Tratamento	Distribuição dos sintomas de acordo com a severidade				% sintomas menos severos
	Necrose total	Pontuações necróticas	Clorose	Sem sintoma	
Testemunha	30	55	5	10	70
Solvente	40	50	5	5	60
Manzate-800	0	0	15	85	100
3	25	50	5	20	75
3a	25	40	0	35	75
3b	50	30	0	20	50
4	55	25	0	20	45
4a	15	55	15	15	85
4b	25	55	0	20	75
1	30	30	0	40	70
1a	45	30	0	25	55

Para o teste com folhas inoculadas com *C. nymphaeae* (Tabela 17), embora no 8º dia apenas o composto **1** apresentava pontos sem sintoma, nota-se que outros tratamentos também apresentam alguma proteção às folhas de macieira, se melhor observado a distribuição dos sintomas manifestados. Obtiveram resultados melhores que a testemunha os compostos **3b**, **4a**, **4b** e **1a**.

Tabela 17. Distribuição percentual dos sintomas de MFG de acordo com a sua severidade, para folhas inoculadas com *C. nymphaeae*.

Tratamento	Distribuição dos sintomas de acordo com a severidade				% sintomas menos severos
	Necrose total	Pontuações necróticas	Clorose	Sem sintoma	
Testemunha	75	25	0	0	25
Solvente	85	15	0	0	15
Manzate-800	0	20	5	75	100
3	90	10	0	0	10
3a	80	20	0	0	20
3b	55	40	5	0	45
4	80	20	0	0	20
4a	55	45	0	0	45
4b	65	30	5	0	35
1	30	55	0	15	70
1a	65	35	0	0	35

Nas condições do experimento, somente o tratamento com Manzate-800, pôde ser considerado eficiente para controle destes fitopatógenos, apresentando controle acima de 80%, como preconizado pela ADAPAR (2015).

Os resultados do teste *ex vivo*, os quais foram tidos como destaque, podem ser considerados promissores mesmo não apresentando resultados muito superiores aos

apresentados pelas testemunhas.

O principal motivo para esta afirmação está relacionado com a concentração de princípio ativo adotada para cada tratamento. Para os compostos, **3**, **3a**, **3b**, **4**, **4a**, **4b**, **1** e **1a**, utilizou-se apenas a mínima concentração capaz de inibir totalmente o crescimento micelial de ambos os fitopatógenos (Tabela 6, p. 61), enquanto que, por exemplo, para Manzate-800[®], a dose recomendada, para proteção da macieira contra doenças causadas por *Colletotrichum* spp., do produto comercial é de 200 g/100 L de água (UPL DO BRASIL INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE INSUMOS AGROPECUÁRIOS S.A.), ajustando as unidade de medida, recomenda-se uma solução contendo 2000 mg · L⁻¹ de Manzate-800[®], 1600 mg · L⁻¹ de mancozebe (princípio ativo), o que estaria 32 vezes mais concentrado do que o CIM encontrado para mancozebe por esta pesquisa (cerca de 50 mg · L⁻¹, Tabela 9, p. 66).

Outro ponto a ser considerado é a utilização de apenas DMSO e o surfactante[®] Adyvex, como produtos para a formulação dos mesmos. A pesquisa e o desenvolvimento de uma nova formulação, poderia ser uma alternativa para potencializar os seus efeitos protetores.

Por último, a quantidade de conídios que chegam ao campo, através dos ventos, no momento de uma infestação, está em uma ordem de grandeza bastante inferior (10² conídios/m³ de ar) à quantidade de conídios que tradicionalmente são aplicados em testes *ex vivo*, como o utilizado para esta pesquisa (1 · 10⁴ conídios/mL) (BERGAMIN FILHO, KIMATI e AMORIM, 1995).

Poder substituir ou mesmo diminuir, a utilização de um princípio ativo, como o da classe dos ditiocarbamatos, que a muito tempo já se conhece seus efeitos deletérios ao ser humano e ao meio ambiente, é desafiador. Lazarević et al. (2017), a partir de predição com o software DataWarrior 46, determinou propriedades toxicológicas de uma séries de ésteres derivados de timol, incluindo os compostos **3**, **3a**, **3b** e **3c**. O estudo revela que estas substâncias apresentam baixo risco de serem mutagênicas, tumorigênicas e causarem alterações reprodutivas. Desta forma, a pesquisa de novos compostos, baseados na química de óleos essenciais, bem como seus derivados não tóxicos, que possuam a capacidade de controlar pragas na agricultura, devem ser cada vez mais levadas em consideração, para que um dia este cenário agrícola mundial, possa ser revertido, tornando as ações humanas cada vez menos danosas ao meio ambiente.

5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira geral, na fase de crescimento micelial, as derivatizações da hidroxila fenólica de eugenol e isoeugenol para éster acetato, mantiveram suas atividades frente aos fungos *C. nymphaeae* e *C. fructicola*, enquanto que, as derivatizações para éster butirato e benzoato, acarretaram em grande perda de atividade. Para timol e carvacrol, as derivatizações à acetato e éster butanoato, não causaram perda acentuada de atividade. Os compostos que apresentaram os melhores resultados para esta fase do desenvolvimento fúngico estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Compostos com melhores resultados para cada um dos testes biológicos.

		Melhores resultados							
Crescimento micelial (mg·L ⁻¹)	<i>C. fructicola</i>	3	4	3a					
	<i>C. nymphaeae</i>	3	4	3a					
CIM (mg·L ⁻¹)	<i>C. fructicola</i>	3	4	3a					
	<i>C. nymphaeae</i>	3	4	3a					
Teste <i>ex vivo</i>	<i>C. fructicola</i>	1	1a	3	3a	3b	4	4a	4b
	<i>C. nymphaeae</i>	1	1a	3b	4a	4b			

Na fase de germinação dos conídios, a concentração inibitória mínima apresentada pelos compostos fenólicos e seus derivados ésteres, manteve a mesma tendência de atividade se comparado ao teste de crescimento micelial, exceto pela atividade apresentada por eugenol e acetato de eugenila, que não inibiram o desenvolvimento fúngico na maior concentração testada (675 mg·L⁻¹). Isoeugenol mostrou ser mais ativo na fase de germinação de conídios se comparado à sua atividade na fase de crescimento micelial.

No teste *ex vivo*, para *C. fructicola*, todos os tratamentos, exceto o tratamento com solvente e surfactante, mostraram resultados de controle melhores que a testemunha no 14º dia. Também para *C. fructicola*, os compostos **1**, **3**, **3a**, **4a** e **4b**, retardaram o desenvolvimento da MFG. No teste *ex vivo*, *C. nymphaeae* foi mais patogênico que *C. fructicola*, no 8º dia de teste apenas o composto **1** apresentava algum controle a MFG. Os compostos **1**, **3b**, **4a**, **4b** e **1a** foram capazes de atrasar o aparecimento de sintomas mais severos da MFG, no entanto, somente o tratamento com Manzate-800, pôde ser considerado eficiente para controle destes fitopatógenos, nas condições do experimento, apresentando controle acima de 80%, como preconizado pela ADAPAR (2015).

Como perspectivas futuras, pode-se citar a necessidade de encontrar uma formulação capaz de melhorar a atividade antifúngica dos compostos testados, como por exemplo, proporcionar espalhamento mais uniforme do princípio ativo, melhorar a interação com a

superfície das folhas, manter a eficácia diminuindo as perdas de princípio ativo decorrentes de ações climáticas ou evitar o contato direto do princípio ativo com a superfície da folha, podendo ser usado como estratégia a técnica de encapsulamento que poderia diminuir a fitotoxidez e potencializar a atividade biológica desejada.

Outras estruturas análogas aos compostos utilizados nesta pesquisa, poderiam ser preparadas, introduzindo nas estruturas, grupos químicos capazes de alterar as suas propriedades físico-químicas, como pKa e log P, visando uma possível potencialização da atividade antifúngica dos mesmos.

Com os resultados acumulados dos testes *in vitro* e *ex vivo*, pode-se selecionar os compostos de melhor atividade (**1**, **1a**, **3**, **3a**, **3b**, **4**, **4a** e **4b**) e propor uma formulação dos mesmos, afim de enviá-los a ensaios pré-campo.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S.; SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A. R.; ABBASZADEH, A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 24, n. 2, p. e51–e56, 2014.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, p. 41–50, 2011.
- ALZATE, D. A. O.; MIER, G. I. M.; AFANADOR, L. K.; DURANGO, D. L. R.; GARCÍA, C. M. P. Evaluation of phytotoxicity and antifungal activity against *Colletotrichum acutatum* of essential oils of thyme (*Thymus vulgaris*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), and its main constituents. **Vitae**, v. 16, n. 1, p. 116–125, 2009.
- AMIRI, A.; DUGAS, R.; PICHOT, A.; BOMPEIX, G. *In vitro* and *in vitro* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 1–2, p. 13–19, 2008.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba: Editora Ceres, v. 1, 704 p., 2011.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 1, 919 p., 1995.
- BHARDWAJ, A.; KUMAR TEWARY, D.; KUMAR, R.; et al. Larvicidal and Structure-Activity Studies of Natural Phenylpropanoids and Their Semisynthetic Derivatives against the Tobacco Armyworm *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 168–177, 2010.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.
- CARRASCO, H.; RAIMONDI, M.; SVETAZ, L.; LIBERTO, M. D.; RODRIGUEZ, M. V.; ESPINOZA, L.; MADRID, A.; ZACCHINO, S. Antifungal Activity of Eugenol Analogues. Influence of Different Substituents and Studies on Mechanism of Action. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 1002–1024, 2012.
- CASTRO, J. C.; ENDO, E. H.; DE SOUZA, M. R.; ZANQUETA, E. B.; POLONIO, J. C.; PAMPHILE, J. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; ABREU FILHO, B. A. de. Bioactivity of essential oils in the control of *Alternaria alternata* in dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.). **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 101–109, 2017.
- CECCONI, S.; PARO, R.; ROSSI, G.; MACCHIARELLI, G. The effects of the endocrine

disruptors dithiocarbamates on the mammalian ovary with particular regard to mancozeb. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 2989-3004, 2007.

CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A. B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L Myrtaceae): A short review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 501–506, 2007.

CHAVAN, P. S.; TUPE, S. G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control**, v. 46, p. 115–120, 2014.

CHENG, T.; ZHAO, Y.; LI, X.; LIN, F.; XU, Y.; ZHANG, X.; LI, Y.; WANG, R.; LAI, L. Computation of Octanol-Water Partition Coefficients by Guiding an Additive Model with Knowledge. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, p. 2140-2148, 2007.

CHUNG, W. H.; ISHII, H.; NISHIMURA, K.; FUKAYA, M.; YANO, K.; KAJITANI, Y. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. **Plant Disease**, v. 90, p. 506–512, 2006.

COOPER, R. L.; GOLDMAN, J. M.; STOKER, T. E. Neuroendocrine and reproductive effects of contemporary-use pesticides. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 26-36, 1999.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G. P. P. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 344–349, 2011.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; MICIELI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 6300-6308, 2007.

DE LIMA, J. R.; VIANA, F. M. P.; LIMA, F. A.; PIENIZ, V.; GONÇALVES, L. R. B. Efficiency of a yeast-based formulation for the biocontrol of postharvest anthracnose of papayas. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 3, p. 203–211, 2014.

DE MORAIS, S. M.; VILA-NOVA, N. S.; BEVILAQUA, C. M. L.; RONDON, F. C.; LOBO, C. H.; DE ALENCAR ARARIPE NORONHA MOURA, A.; SALES, A. D.; RODRIGUES, A. P. R.; DE FIGUEREIDO, J. R.; CAMPELLO, C. C.; WILSON, M. E.; DE ANDRADE, H. F. Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6250–6255, 2014.

DEV, U.; DEVAKUMAR, C.; MOHAN, J.; AGARWAL, P. C. Antifungal Activity of Aroma Chemicals Against Seed-borne Fungi. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 5, p. 496–499, 2004.

DI PASQUA, R.; BETTS, G.; HOSKINS, N.; EDWARDS, M.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 4863–4870, 2007.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308–316, 2000.

FAID, M.; CHARAI, M.; MOSADDAK, M. Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Organum majorana* L. and *O. compactum* Benth. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 657–664, 1996.

FERRAZ, L. P.; CUNHA, T. DA; DA SILVA, A. C.; KUPPER, K. C. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. **Microbiological Research**, v. 188–189, p. 72–79, 2016.

FISCHER, I. H.; DA SILVA, B. L.; SOARES, A. R. Efeito de fungicidas e produtos alternativos no controle da antracnose e da pinta preta da goiaba. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 0, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). FAOSTAT: Crops. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> >. Acesso em: 26 abr. 2018.

FORNARI, T.; VICENTE, G.; VÁZQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M. R.; REGLERO, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, p. 34–48, 2012.

FRISONI, G. B.; Di MONDA, V. Disulfiram neuropathy: a review (1971-1988) and report of a case. **Alcohol and Alcoholism**, v. 24, p. 429-437, 1989.

GAO, T.; ZHOU, H.; ZHOU, W.; HU, L.; CHEN, J.; SHI, Z. The fungicidal activity of thymol against *Fusarium graminearum* via inducing lipid peroxidation and disrupting ergosterol biosynthesis. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 1–13, 2016.

GARCIA, M. J. B. Desenvolvimento de Novo Fungicida Visando o Controle do Fitopatógeno do Pêssego, Monilinia Fructicola, no Pré e Pós-Colheita. 2017. 63 f. **Dissertação** (Mestrado em Química) – Departamento de química, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

GAVA, C. A. T.; DE CASTRO, A. P. C.; PEREIRA, C. A.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Isolation of fruit colonizer yeasts and screening against mango decay caused by multiple pathogens. **Biological Control**, v. 117, p. 137–146, 2018.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. 78p.

GILL, A.; HOLLEY, R. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 1–9, 2006.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 170–174, 2006.

GIORGIO, A.; DE STRADIS, A.; LO CANTORE, P.; IACOBELLIS, N. S. Biocide effects of

volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.

GROVER, R. K.; MOORE, J. D. Toximetric studies of fungicides against brown rot organism. *Sclerotinia fruticola*. **Phytopathology**, v. 52, p. 876-880, 1962.

HAMADA, N.A. Influência da temperatura e do período de molhamento foliar (PMF) na incidência e severidade da mancha-foliar-da-gala (*Colletotrichum* spp.). **Agropecuária Catarinense**, v. 18, p. 73-77, 2005.

HAMADA, N. A. Epidemiologia da Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

HAMADA, N. A.; KATSURAYAMA, Y.; DANTAS, A. C. M. Sensibilidade “in vitro” ao benomyl por isolados de *Colletotrichum* spp. associados à mancha da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 347-351, 2009.

HAMMER, K. A.; HEEL, K. A. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 3, p. 239–245, 2012.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L.G.M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590–3595, 1998.

HERATH, H.; ABEYWICKRAMA, K. In vitro application of selected essential oils and their major components in controlling fungal pathogens of crown rot in Embul banana (*Musa acuminata*– AAB). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 3, p. 440–447, 2008.

HINTZ, T.; MATTHEWS, K. K.; DI, R. The Use of Plant Antimicrobial Compounds for Food Preservation. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

HOUETO, P.; BINDOULA, G.; HOFFMAN, J. R. Ethylenebisdithiocarbamates and ethylenethiourea: possible human health hazards. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 568-573, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola. **Relatório Mensal**. Rio de Janeiro, v. 30, n. 12 p.1-82, 2017.

JANICK, J.; CUMMINS, J. N.; BROWN, S. K.; HEMMAT, M. Apples. In: JANICK, J. e MOORE, J. N. **Fruit Breeding: Tree and Tropical Fruits**, v. 1. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1996. p. 1-77.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S.; BECKER, W. F. Mancha foliar da gala: principal doença de verão da cultura da macieira. **Agropecuária catarinense**, v. 13, p. 14-20, 2000.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Manejo das doenças de verão da macieira no sul do Brasil. In: STADNIK MJ (Ed.) Manejo Integrado de Doenças da Macieira. Florianópolis, CCA-UFSC, p. 45-64, 2009.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Manejo da mancha da gala. **Agropecuária catarinense**, v. 25, n. 2, p. 45-51, 2012. Suplemento.

KHAN, M. S.; AHMAD, I.; CAMEOTRA, S. Phenyl aldehyde and propanoids exert multiple sites of action towards cell membrane and cell wall targeting ergosterol in *Candida albicans*. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 1-16, 2013.

KILDEAA, M. A.; ALLANB, G. L.; KEARNEY, R. E. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-STM from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v. 232, p. 265–277, 2004.

KOWATA, L. S.; STRAPASSON, M.; CHALLIOL, M. A.; MAY-DE MIO, L. L. Glomerella leaf spot in apple: validation of proposed diagrammatic scale and efficiency of fungicides. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1502–1508, 2010.

KRETZCHMAR, A.; MARODIN G. A. B.; DUARTE, V. Ocorrência e intensidade de Marssonina mali em macieira nas condições da depressão central do RS. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 4, n. 2, p. 145–147, 2005.

KRASNIAK, M. Prospeção de Biofungicidas Visando o Desenvolvimento de Metodologia Para o Controle Biorracional do Fitopatógeno do Pêssego Monilinia Fructicola no Pré e Pós-Colheita. 2015. 78 f. **Dissertação** (Mestrado em Química) – Departamento de química, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G.-J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453–462, 2001.

LA STORIA, A.; ERCOLINI, D.; MARINELLO, F.; DI PASQUA, R.; VILLANI, F.; MAURIELLO, F. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 164-172, 2011.

LAZAREVIĆ, J.; KOLAREVIĆ, A.; ĐORĐEVIĆ, A.; STOJANOVIĆ, G.; ŠMELCEROVIĆ, A.; CIUFFREDA, P.; SANTANIELLO, E. Synthesis, Antimicrobial Activity and in silico Studies on Thymol Esters. **Acta Chimica Slovenica**, v. 64, n. 3, p. 603–612, 2017.

LIU, Y.; LI, B.; WANG, C.; LIU, C.; KONG, X.; ZHU, J.; DAI, H. Genetics and Molecular Marker Identification of a Resistance to Glomerella Leaf Spot in Apple. **Horticultural Plant Journal**, v. 2, n. 3, p. 121–125, 2016.

MARCHESE, A.; ORHAN, I. E.; DAGLIA, M.; BARBIERI, R.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S. F.; GORTZI, O.; IZADI, M.; NABAVI, S. M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**, v. 210, p. 402-414, 2016.

MARTIN, R.; DEMERSEMAN, P. Titanium Tetrachloride Induced Fries Rearrangement: A New Route to Disubstituted 2'-Hydroxypropiophenones. **Synthesis**, v. 20, p. 25-28, 1989.

MATHELA C. S.; SINGH, K. K.; GUPTA, V. K. Synthesis and *in vitro* Antibacterial Activity Of Thymol And Carvacrol Derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 4, p. 375–380, 2010.

MICHIELS, J.; MISSOTTEN, J.; FREMAUT, D.; DE SMET, S.; DIERICK, N. *In vitro* dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. **Livestock Science**, v. 109, n. 1–3, p. 157–160, 2007.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Política Agrícola. Maçã. **Informativo n. 54**, v. 54, 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Sistemas de Agrotóxicos Fitosanitários (Agrofit). Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 01 maio 2018.

MOREIRA, R. R.; CASTELLAR C.; HAMADA, N. A.; MAY DE MIO, L. L. Sensitivity of *Colletotrichum* spp., associated to Glomerella leaf spot in apple, to mancozeb and thiophanate methyl. In: Deising HB; Fraaije B; Mehl A; Oerke EC; Sierotzki H; Stammer G (Eds), "Modern Fungicides and Antifungal Compounds", Vol. VIII, pp. 83-xxx. © 2016 Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, ISBN: 978-3-941261-xx-x [pre-formatted Style FFTitelage].

NARAYANASAMY, P. **Postharvest Pathogens and Disease Management**. 1 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 578 p., 2006.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **M38-A**: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada. Wayne, U.S.A, 2002.

NOSTRO, A.; SCAFFARO, R.; D'ARRIGO, M.; BOTTA, L.; FILOCAMO, A.; MARINO, A.; BISIGNANO, G. Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 4, p. 1029–1038, 2012.

NUMPAQUE, M. A.; OVIEDO, L. A.; GIL, J. H.; GARCÍA, C. M.; DURANGO, D. L. Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 3–13, 2011.

ORO, L.; FELIZIANI, E.; CIANI, M.; ROMANAZZI, G.; COMITINI, F. Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. *International Journal of Food Microbiology*, v. 265, p. 18–22, 2018.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução a Espectroscopia**. Tradução de Pedro Barros. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 700 p., 2010.

PARANÁ. Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR). Portaria nº 91, de 21 de Maio de 2015. Dispõe sobre procedimento para cadastro de agrotóxicos e afins no Estado do Paraná, para o uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícola, florestas plantadas e pastagens. **Secretaria da Agricultura e Abastecimento**, Curitiba, PR, 25 de Maio 2015, DOE nº 9458. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GABINETE/PORTARIAS/2015/91_15.pdf>. Acesso em: 27/07/2018.

PESCE, V. M.; NALLY, M. C.; CARRIZO, G. P.; ROJO, C.; PÉREZ, B. A.; TORO, M. E.; DE FIGUEROA, L. I. C.; VAZQUEZ, F. Antifungal activity of native yeasts from different microenvironments against *Colletotrichum gloeosporioides* on ripe olive fruits. **Biological Control**, v. 120, p. 43–51, 2018.

PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; COUTO, M.; FRANCESCOTTO, E. P. Advances of the apple crop in Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 1, p. 48–56, 2011.

RAO, A.; ZHANG, Y.; MUEND, S.; RAO, R. Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5062–5069, 2010.

ROBERTS, S. K.; MCAINSH, M.; CANTOPHER, H.; SANDISON, S. Calcium Dependence of Eugenol Tolerance and Toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–8, 2014.

ROMERO, A. L.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R. C.; DINIZ, S. S. S. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. **UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde**, v. 11, p. 15-8, 2009.

SHUSTERMAN, A. J.; MCDUGAL, P. G.; GLASFELD, A. Dry-Column Flash Chromatography. **Journal of Chemical Education**, v. 74, n. 10, p. 1222-1223, 1997.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B.; WAGENINGEN, E. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201–222, 1995.

STARLIPER, C. E.; KETOLA, H. G.; NOYES, A. D.; SCHILL, W. B.; HENSON, F. G.; CHALUPNICKI, M. A.; DITTMAN, D. E. An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 1, p. 89–97, 2015.

STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. **Journal of Organic Chemistry**, v.43, n. 14, p. 2923-2925, 1978.

SUVARNA, J.; BASHA, S. T.; HEMALATHA, T. M.; REDDY, N. P. E. Efficacy of fungicides against *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose. **Indian Journal of Plant Protection**, v. 37, p. 201-203, 2009.

SVIRCEV, A. M.; SMITH, R. J.; ZHOU, T.; HERNADEZ, M.; LIU, W.; CHU, C. L. Effects of thymol fumigation on survival and ultrastructure of *Monilinia fructicola*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, n. 2, p. 228–233, 2007.

TAM, G.; LI, Z.; XUE, L.; LI, L. Influence of propiconazole and *Bacillus subtilis* on the control effect of postharvest anthracnose of apple fruit. **Acta Laser Biology Sinica**, v. 2, 2008.

TIAN, Y.; LI, W.; JIANG, Z.; JING, M.; SHAO, Y. The preservation effect of *Metschnikowia pulcherrima* yeast on anthracnose of postharvest mango fruits and the possible mechanism. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 95–105, 2018.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, n. 3, p. 235–245, 2004.

TSAO, R.; ZHOU, T. Antifungal Activity of Monoterpenoids against Postharvest Pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 1, p. 113–121, 2000.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561–1568, 2002.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food- borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4606–4610, 1999.

UPL DO BRASIL INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE INSUMOS AGROPECUÁRIOS S.A. **MANZATE 800: Pó Molhável (WP)**. Ituverava/SP, 2017. Rotulo.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; BECKER, W.; BONETI, J.I.S.; KATSURAYAMA, Y.; CZERMAINSKI, A.B.C. Manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã. **Circular técnica**. Embrapa, n.36, 2002.

VELDHUIZEN, E. J. A.; TJEERDSMA-VAN BOKHOVEN, J. L. M.; ZWEIJTZER, C.; BURT, S. A.; HAAGSMAN, H. P. Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1874–1879, 2006.

VILAPLANA, R.; PAZMIÑO, L.; VALENCIA-CHAMORRO, S. Control of anthracnose, caused by *Colletotrichum musae*, on postharvest organic banana by thyme oil. **Postharvest Biology and Technology**, v. 138, p. 56–63, 2018.

VODA, K.; BOH, B.; VRTAČNIK, M. A quantitative structure-antifungal activity relationship study of oxygenated aromatic essential oil compounds using data structuring and PLS regression analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v. 10, p. 76–84, 2004.

XIE, Y.; HUANG, Q.; WANG, Z.; CAO, H.; ZHANG, D. Structure-activity relationships of cinnamaldehyde and eugenol derivatives against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 388–394, 2017.

XIE, Y.; WANG, Z.; HUANG, Q.; ZHANG, D. Antifungal activity of several essential oils and major components against wood-rot fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 278–285, 2017.

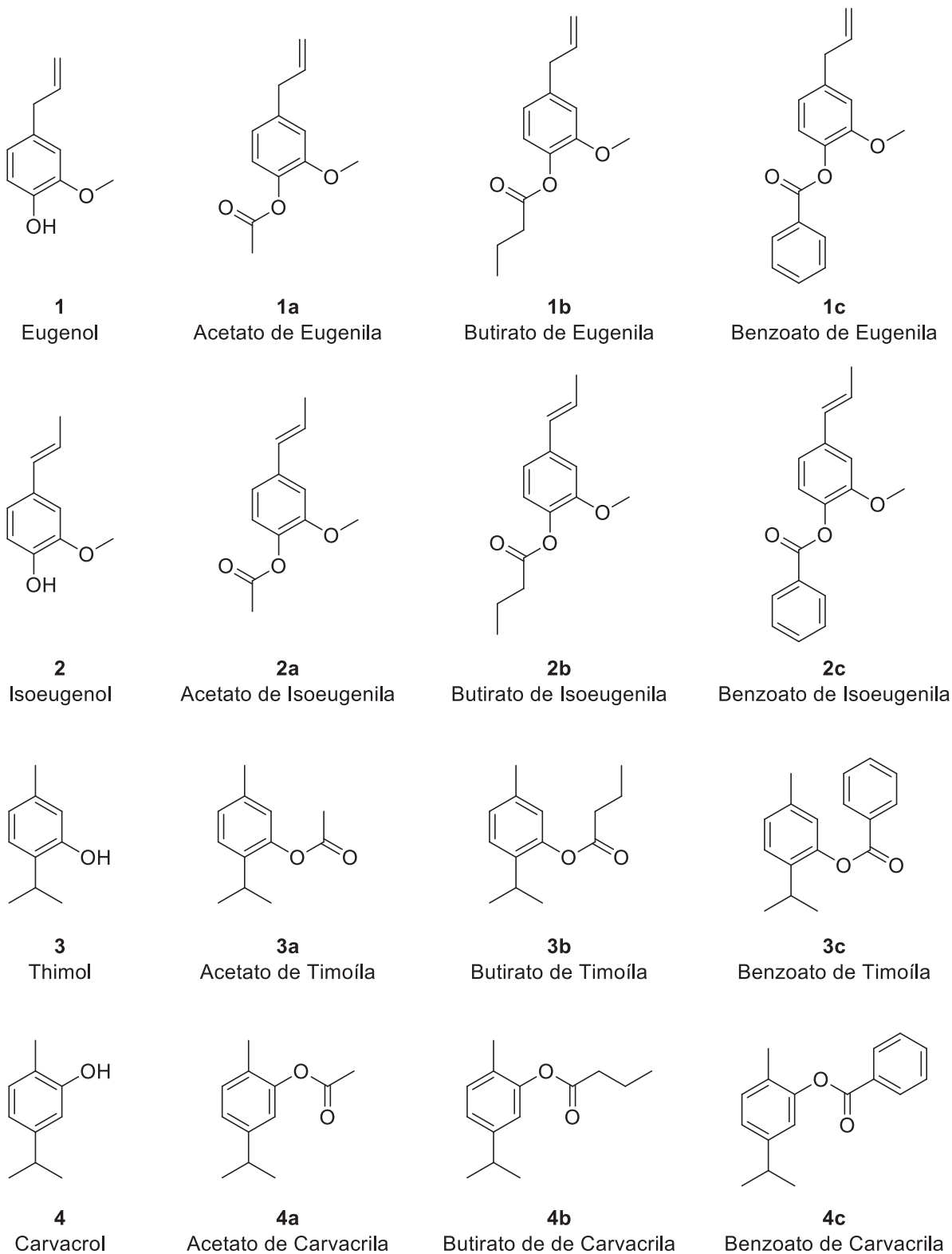
XU, J. G.; LIU, T.; HU, Q. P.; CAO, X. M. Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1194, 2016.

XU, J.; ZHOU, F.; JI, B. P.; PEI, R. S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 174–179, 2008.

ZHOU, D.; WANG, Z.; LI, M.; XING, M.; XIAN, T.; TU, K. Carvacrol and eugenol effectively inhibit *Rhizopus stolonifer* and control postharvest soft rot decay in peaches. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 166–178, 2018.

ANEXO 1

Figura 33. Estruturas químicas e suas respectivas numerações.

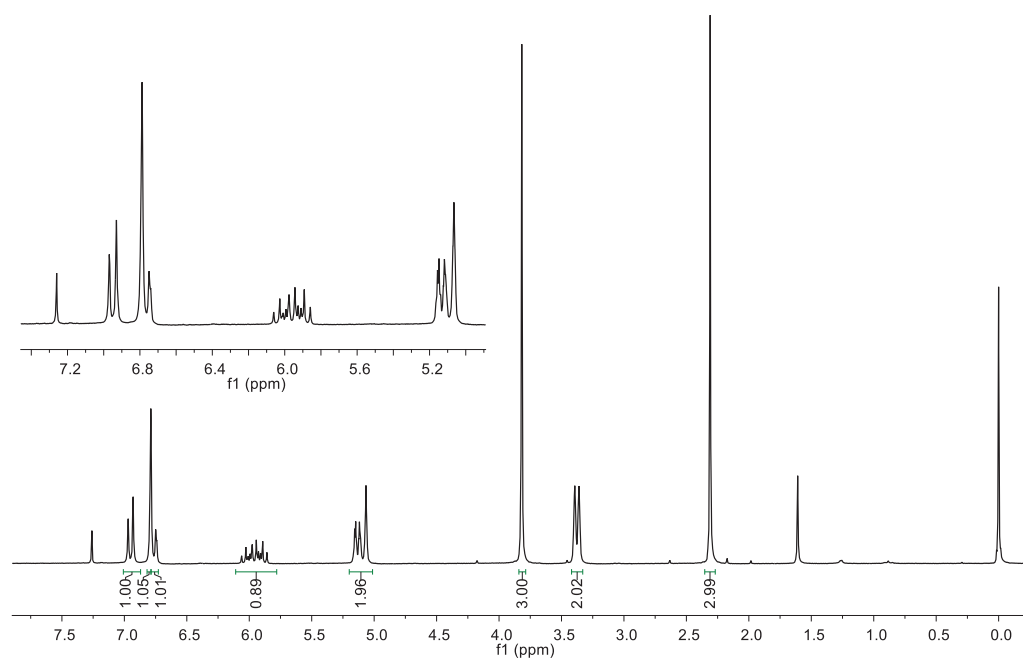


ANEXO 2

Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

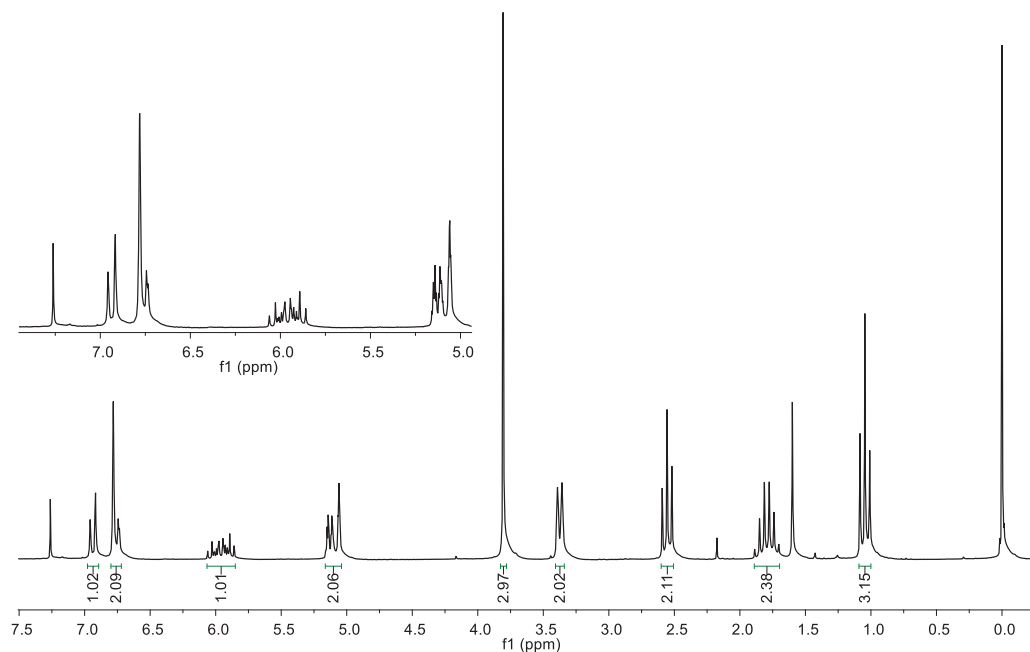
Acetato de Eugenila, **1a** (acetato de 4-alil-2-metoxifenila).

Figura 34. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto **1a**, com expansão da região entre 5,0 e 7,5.



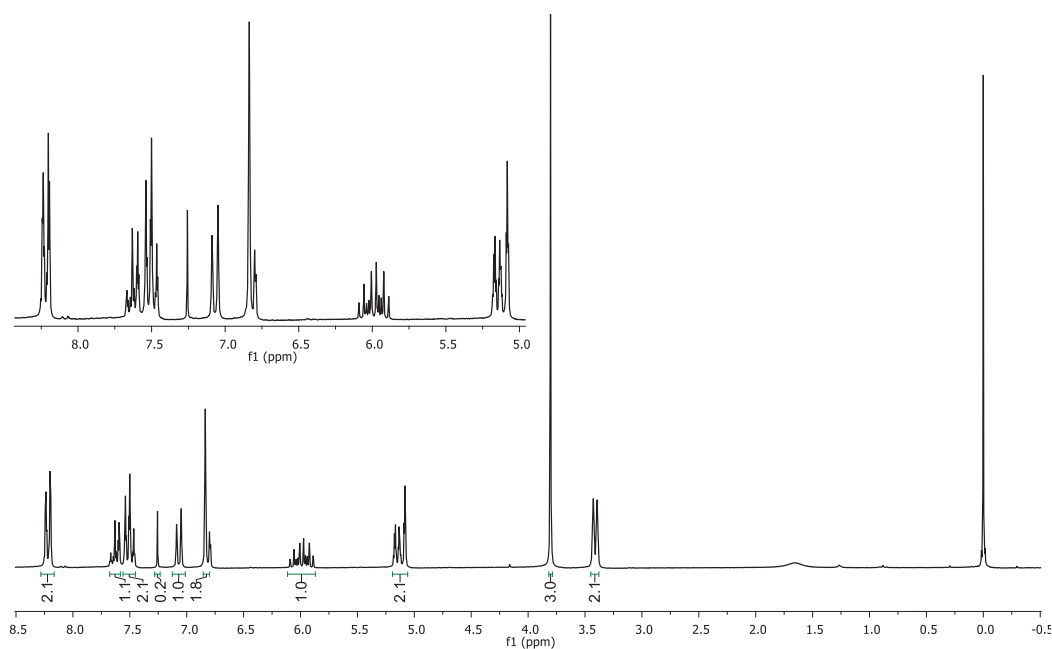
Butirato de Eugenila, **1b** (butirato de 4-alil-2-metoxifenila)

Figura 35. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto **1b**, com expansão da região entre 5,0 e 7,5.



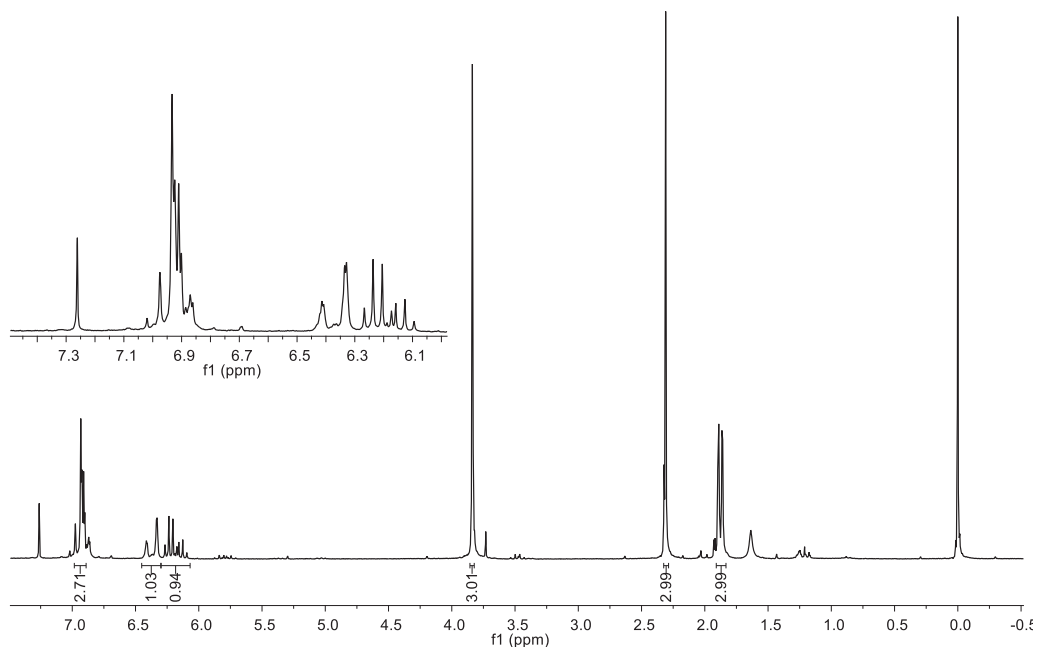
Benzoato de Eugenila, **1c** (benzoato de 4-alil-2-metoxifenila)

Figura 36. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto **1c**, com expansão da região entre 5,0 e 8,5.



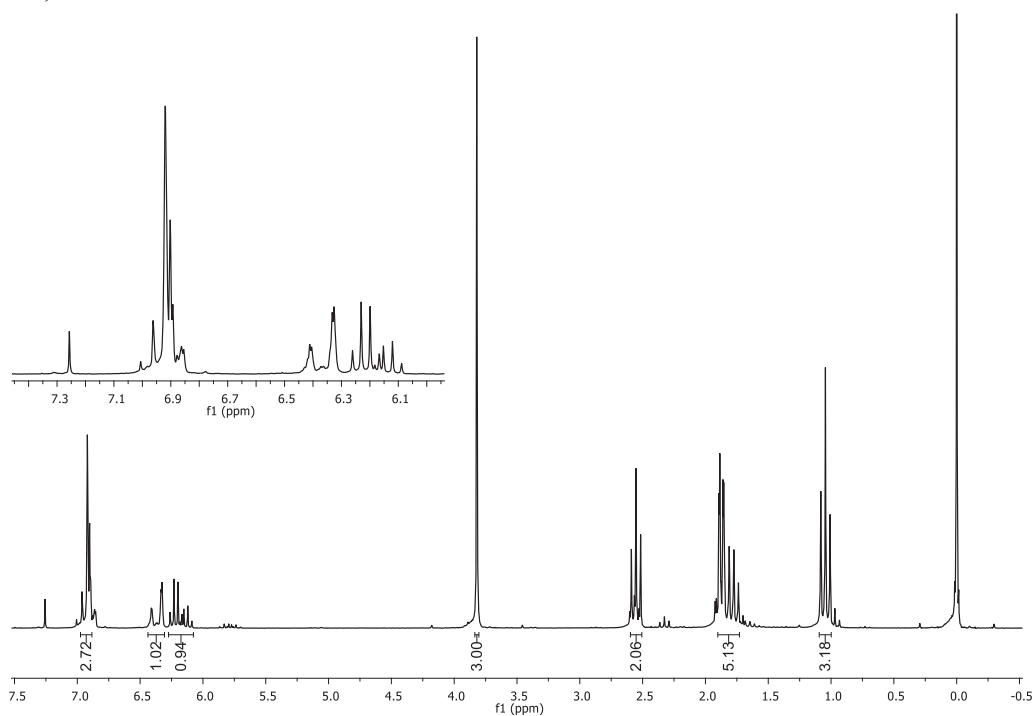
Acetato de Isoeugenila, **2a** (acetato de (*E*)-2-metoxi-4-(prop-1-en-1-il)fenila).

Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto **2a**, com expansão da região entre 5,5 e 7,5.



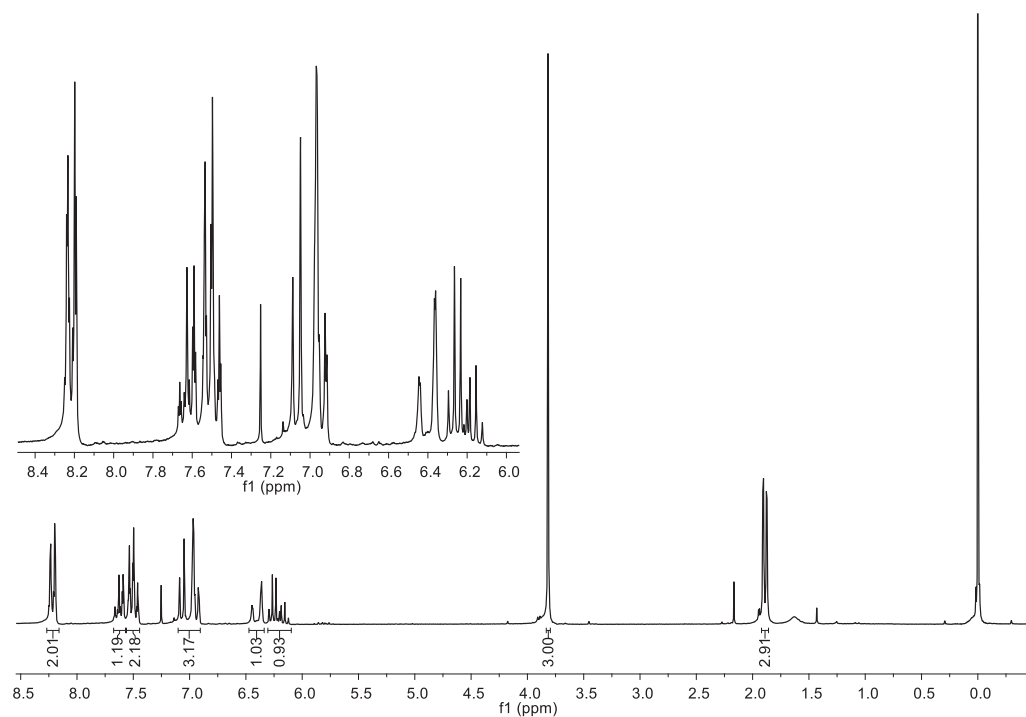
Butirato de Isoeugenila, **2b** (butirato de (*E*)-2-metoxi-4-(prop-1-en-1-il)fenila).

Figura 38. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto **2b**, com expansão da região entre 5,5 e 7,5.



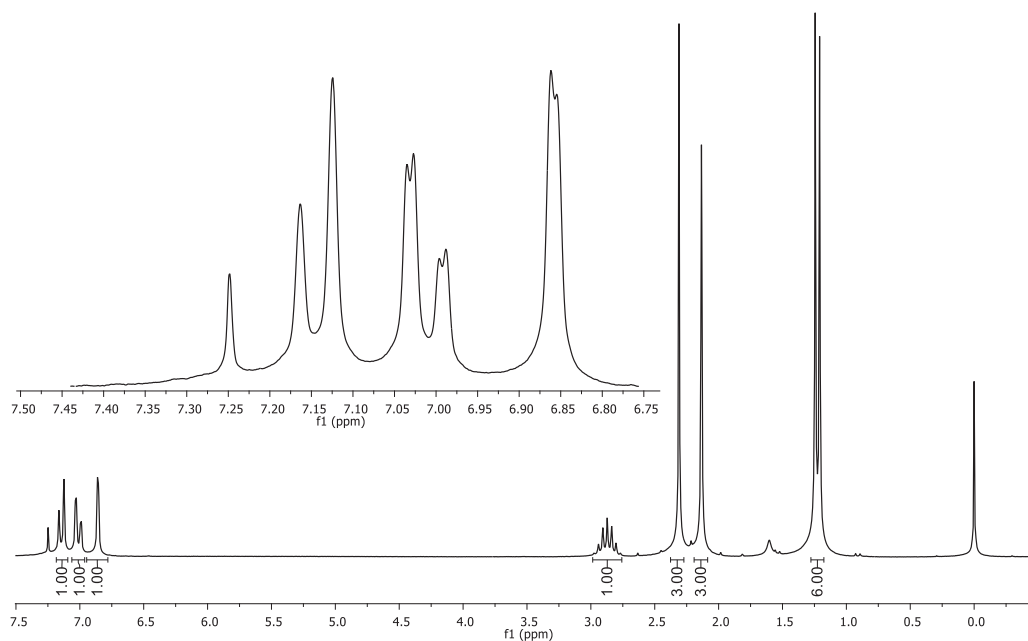
Benzoato de Isoeugenila, **2c** (Benzoato de (*E*)-2-metoxi-4-(prop-1-en-1-il)fenila)

Figura 39. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto **2c**, com expansão da região entre 6,0 e 8,5.



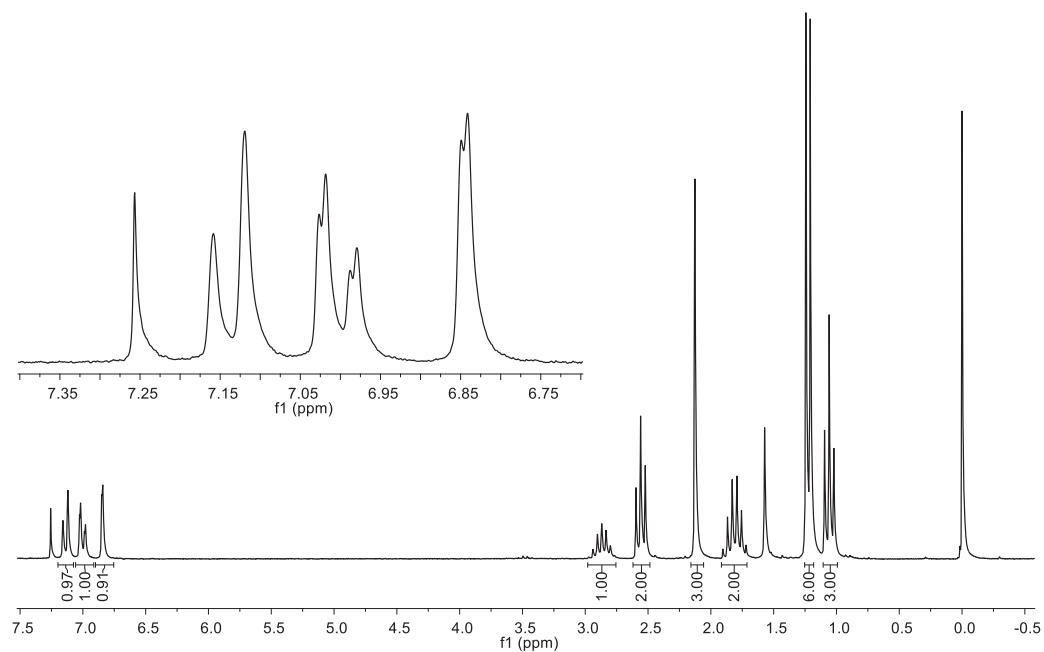
Acetato de Carvacrila, **4a** (acetato de 5-isopropil-2-metilfenila).

Figura 40. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto **3a**, com expansão da região entre 6,5 e 7,5.



Butirato de Carvacrila, **4b** (butirato de 5-isopropil-2-metilfenila).

Figura 41. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto **3b**, com expansão da região entre 6,7 e 7,4.



Benzoato de Carvacrila, **4c** (benzoato de 5-isopropil-2-metilfenila).

Figura 42. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, CDCl_3), correspondente ao composto **3c**, com expansão da região entre 6,5 e 8,5.

